

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DE L'EXPRESSION DE MFSD2A, LE RÉCEPTEUR DE LA
SYNCYTINE-2, PAR L'ÉTUDE DE SON PROMOTEUR AINSI QUE SA
LOCALISATION CELLULAIRE ET EXTRACELLULAIRE (EXOSOMES) AU
NIVEAU PLACENTAIRE.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

XAVIER ELISSEFF

MAI 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au département des sciences biologiques de l'Université du Québec À Montréal sous la direction du Dr Benoit Barbeau et la codirection du Dr Eric Rassart, membres du centre de recherche BioMed.

Je tiens à remercier sincèrement Benoit et Eric pour m'avoir permis d'aller au bout de cette maîtrise dans de bonnes conditions. Je n'oublie pas la participation importante de la Dre Julie Lafond qui a toujours été de très bons conseils ainsi que tous les autres professeurs qui ont permis, tout au long de ma scolarité, de forger la personne que je suis aujourd'hui. Je n'oublie pas toutes les personnes formidables avec lesquelles j'ai eu le privilège de travailler durant ces dernières années, que ce soit d'autres étudiants, techniciens, enseignants et chercheurs.

Enfin je tiens à remercier très spécialement les membres de mon laboratoire, qui ont été une force au quotidien et qui sont devenus à mes yeux une nouvelle famille. Merci Caroline de m'avoir lancé de la glace pour me motiver quand j'en avais besoin, d'avoir participé activement à mes manips et pour tout ce que tu fais encore aujourd'hui. Merci Clément pour cette amitié que je ne saurais décrire. Merci aussi à Kevin, Mellisha, Yong, Zhenlong et Antoine d'avoir été là.

Je tiens finalement à dédier ce travail à ma famille et mes amis, mais plus particulièrement à ma mère, Anne, mon père, Éric, mes frères Marc et Louis ainsi que ma sœur, Margaux, sans qui je ne serais jamais devenu l'homme que je suis aujourd'hui. Merci de m'avoir soutenu, d'avoir cru en moi et surtout de m'avoir permis de démarrer cette nouvelle vie au Canada.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
LISTE DES UNITÉS	xi
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	4
1.1 Les rétrovirus	4
1.2 Les HERV	9
1.3 Le placenta	13
1.4 Les promoteurs génomiques	16
1.5 MFSD2a	18
1.4 Les exosomes	24
CHAPITRE II	
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	27
CHAPITRE III	
MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE.....	28
3.1 Recherche et caractérisation des ARN de MFSD2a dans les cellules BeWo, JAR, JEG-3 et CTV	29
3.1.1 Extraction des ARN totaux des cellules HEK293T, BeWo, JAR, JEG-3 et CTV	29
3.1.2 Détection des ARNm codants pour MFSD2a	29
3.1.3 Vérification de la position du site d'initiation de la transcription.....	30
3.2 Localisation et caractérisation de la région promotrice du gène MFSD2a	32

3.2.1	Clonage des régions en amont du gène MFSD2a dans le plasmide pGL3-Basic	32
3.2.2	Transfection des différentes constructions dans les cellules HEK293T, BeWo, JAR, JEG-3 et CTV	33
3.2.3	Dosage de l'activité luciférase et identification de la région promotrice.	33
3.3	Détection de la protéine MFSD2a au niveau cellulaire et exosomal	34
3.3.1	Transfection des cellules HEK293T, COS-7, BeWo et microporation des cellules CTV	34
3.3.2	Détection de la protéine dans des lysats cellulaires et exosomes par immunobuvardage	34
3.3.3	Vérification de la présence de MFSD2a membranaire sur les cellules et exosomes de cellules HEK293T, transfectées avec MFSD2-V5, par cytométrie en flux et immunofluorescence	36
3.4	Tests statistiques.....	38
CHAPITRE IV		
RÉSULTATS		39
4.1	Caractérisation des ARNm de MFSD2a dans les lignées cellulaires BeWo, JAR et JEG-3.	39
4.1.1	Analyses RT-PCR pour MFSD2a sur les ARN totaux de cellules HEK293T, BeWo, CTV, JAR et JEG-3.....	39
4.1.2	Analyse 5' RACE des ARN totaux de HEK293T afin d'identifier le site d'initiation de transcription	40
4.2	Localisation et caractérisation de la région promotrice du gène MFSD2a	42
4.2.1	Clonage de la région en amont du gène MFSD2a dans le plasmide PGL3-Basic	42
4.2.2	Analyse de l'activité promotrice de MFSD2a par l'utilisation de mutants de délétions.....	43
4.3	Détection de la protéine MFSD2a dans les cellules et exosomes des cellules HEK293T, BeWo et CTV.....	47
4.3.1	Détection de la protéine MFSD2a dans le cerveau et le cytotrophoblastes villosus par immunobuvardage.....	47
4.3.2	Vérification de la présence de MFSD2a membranaire sur les cellules par immunofluorescence.	49
4.3.3	Vérification de la présence de MFSD2a dans les exosomes par cytométrie en flux.....	54

CHAPITRE V	56
DISCUSSION ET CONCLUSIONS	56
5.1 Caractérisation de l'ARNm.....	56
5.2 Caractérisation de la région promotrice	58
5.3 Localisation de la protéine MFSD2a.....	60
BIBLIOGRAPHIE	65

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Organisation générale de l'ARN d'un rétrovirus.....	5
1.2 Cycle de réplication des rétrovirus	7
1.3 Représentation schématique de la séquence intégrée d'un rétrovirus	8
1.4 Mécanisme d'endogénisation rétroviral.....	10
1.5 Arbre phylogénétique des rétrovirus humains	11
1.6 Conséquence de l'interaction entre une protéine d'enveloppe et son récepteur	12
1.7 Schéma de l'unité meterno-fœtale et de la villosité chorale	13
1.8 Identification de la région promotrice de Syncytine-2 répondant à la forskoline dans les cellules BeWo	16
1.9 Promoteur minimal complexé avec l'ARN polymérase II et les GTFs montrant les éléments de régulations.....	17
1.10 Niveau d'expression des ARNm et protéique de MFSD2a dans différents tissus.....	19
1.11 Analyse <i>in situ</i> de section de villosités chorales humaines pour l'expression de Syncytine-2 et MFSD2a.....	20
1.12 Domaines transmembranaires et représentation 3D de l'isoforme 2 de MFSD2a (530 aa).....	21
1.13 Schéma des interactions connues avec MFSD2a.....	22
1.14 Biogenèse des exosomes.....	25
3.1 Isolement des exosomes par ultracentrifugation différentielle	36
3.2 Schéma de bille de phényl-sépharose avec des exosomes fixés à leur surface et marqués avec des anticorps.....	38

4.1	Analyse de l'expression de MFSD2a dans les lignées cellulaires de choriocarcinomes	39
4.2	Produit de PCR de la dernière PCR nichée de la réaction de 5'RACE des ARN totaux de cellules HEK293T	40
4.3	5'RACE effectué sur les ARN totaux de cellules HEK293T	41
4.4	Schéma des différentes régions du promoteur du gène MFSD2a cloné dans le plasmide pGL3-Basic.....	42
4.5	Niveaux d'expression relative de la luciférase des différents clones dans les cellules HEK293T	43
4.6	Activité promotrice des différents mutants de délétions du promoteur dans les cellules BeWo	44
4.7	Induction de l'activité promotrice des mutants de délétion de MFSD2a dans les cellules BeWo suite à l'activation par la forskoline.....	46
4.8	Immunobuvardage anti-MFSD2a sur lysats de cerveaux ou CTV humains..	47
4.9	Immunobuvardage anti-V5 sur lysats de cellules fusionnant, exprimant MFSD2a ou MFSD2a-V5 et Syncytin-2.....	48
4.10	Vérification de la détection et colocalisation du tag V5 et MFSD2a dans les cellules COS-7	49
4.11	Vérification de l'expression de MFSD2a et MFSD2a-V5 dans les cellules HEK293T	50
4.12	Analyse de l'expression de MFSD2a-V5 au cours du temps par immunofluorescence dans des cellules HEK293T	51
4.13	Co-expression de MFSD2a-V5 et Syncytine-2 dans des cellules HEK293T.	52
4.14	Détection de MFSD2a-V5 dans les cellules HEK293T transfectées avec MFSD2a-V5 et Syncytine-2	53
4.15	Détection de la protéine MFSD2a à la surface des exosomes provenant de HEK293T transfectées avec MFSD2a-V5.....	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau III.I Condition de PCR et amorces pour la détection des ARNm codants et les clonages de la région promotrice de MFSD2a.	30

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa : acides aminés

ADN : Acide Desoxiribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

CMV : Corps Multivésiculaire

CTV : Cytotrophoblastes Villeux

FSK : Forskoline

GCM1 : Glial Cells Missing Homolog 1

HERV : Rétrovirus endogènes humain (*Human Endogenous Retro Viruses*)

HSP : Heat Shock Protein

LPC : Lysophosphatidylcholine

LTR : Long Terminal Repeat

MFSD2a : Major Facilitator Superfamily Domain-containing protein 2A

nt : nucléotides

PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate-buffered saline*)

PE : Pré-éclampsie

PLAP : Placental Alkaline Phosphatase

RACE : Rapid Amplification of cDNA End

RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

STB : Syncytiotrophoblaste

SU : Glycoprotéine de Surface

Syncytine-1 : S1

Syncytine-2 : S2

TM : Domaine Transmembranaire

TSG : Tumor Susceptibility Gene

TSS : Transcription Start Site

VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine

VIL : Vésicules Intra Luminales

LISTE DES UNITÉS

°C : Degrés Celcius

% : pourcentage

M : mol / l

l : litre

g : gramme

μ : micro

m : mili

n : nano

RÉSUMÉ

La protéine MFSD2a est un récepteur membranaire exprimé dans la plupart des tissus du corps humain. Dans le placenta, elle forme un complexe ligand-récepteur avec Syncytine-2. Ceci permet la formation et le renouvellement du syncytiotrophoblaste, une zone d'échange facilitée entre le sang de la mère et du fœtus. Contrairement à Syncytine-2, ni la régulation de l'expression, ni sa présence à la surface des cellules ou leurs exosomes ne sont connus pour MFSD2a. Ce projet a donc pour but de déterminer ces caractéristiques. Nous supposons qu'il existe une modulation transcriptionnelle importante de MFSD2a au niveau placentaire, et que la protéine est présente à la surface des cellules et leurs exosomes. Afin de tester ces hypothèses, trois étapes seront nécessaires : 1) rechercher et caractériser les ARNm codants pour MFSD2a dans différents types cellulaires; 2) localiser la région promotrice du gène MFSD2a et 3) détecter la protéine MFSD2a dans différents types cellulaires et leurs exosomes. Pour ce faire, nous aurons recours à l'utilisation de techniques suivantes : RT-PCR, 5'RACE, immunobuvardage, essais luciférase, cytométrie en flux et microscopie confocale. Les résultats obtenus montrent qu'il existe des éléments de régulation synergique en amont du gène codant pour MFSD2a et que son expression peut être induite par le biais de son promoteur. La forskoline augmente l'activité de la région promotrice de MFSD2a de la même manière que celle de Syncytine-2. La localisation de la protéine MFSD2a, à la membrane et à l'intérieur des syncytia, a été mise en évidence dans différents types cellulaires à l'aide de la microscopie confocale et dans des exosomes grâce à la cytométrie en flux. La poursuite de l'étude de cette protéine est importante afin d'améliorer nos connaissances fondamentales et notre compréhension des maladies placentaires.

Mots clés : Reproduction, placenta, MFSD2a, Exosomes, Promoteur

INTRODUCTION

Cette recherche s'inscrit dans une problématique générale de compréhension du rôle des protéines rétrovirales endogènes humaines et de leurs partenaires d'interaction au niveau placentaire, afin de déterminer leurs impacts potentiels dans un cadre pathologique.

Les rétrovirus endogènes humains (HERV) sont des rétrovirus qui ont infecté des cellules germinales humaines il y a plusieurs dizaines de millions d'années (van der Kuyl, 2012). Suite à une accumulation de mutations dans leur génome, ces rétrovirus ont perdu leur capacité de réplication et d'infection. Cependant, certains gènes persistent et sont toujours en mesure de coder efficacement pour des protéines d'enveloppe comme les Syncytines. Les Syncytines-1 et -2 (SI et S2) sont des protéines d'enveloppe rétrovirales qui conféraient au virus sa capacité fusogénique (Blaise et al., 2003). Celles-ci leur permettaient d'infecter les cellules en interagissant avec des protéines membranaires fréquemment retrouvées à la surface des cellules, comme MFSD2a. En effet, MFSD2a est un symporteur de lysophosphatidylcholine (LPC) présent dans beaucoup de tissus du corps humain (Uhlen et al., 2015). La relation ligand-récepteur qui existe aujourd'hui entre Syncytine-2 et MFSD2a se retrouve au niveau du placenta et permet la fusion des cellules trophoblastiques (Renard et al., 2005). Ces cellules vont former le syncytiotrophoblaste (STB), une zone d'échange privilégiée entre la mère et le fœtus.

Le placenta est un organe transitoire, présent uniquement au cours de la grossesse, qui permet les échanges nutritionnels et le maintien de l'équilibre immunitaire entre la mère et le fœtus. Il a aussi été démontré que le placenta est une

source importante de vésicules extracellulaires telles que les exosomes (Sarker et al., 2014).

Les exosomes sont des vésicules d'environ 40 à 100 nm provenant du compartiment endosomal. Dans le cytoplasme cellulaire, certains endosomes vont subir des invaginations de leur membrane vers la lumière et former des corps multivésiculaires (CMV) contenant des vésicules intra-luminales (VIL). La fusion de certains CMV avec la membrane cellulaire libère les VIL dans l'espace extracellulaire (Keller et al., 2006). Une fois libérée dans le domaine extracellulaire, on les appelle alors exosomes. Ces derniers jouent un rôle majeur dans la communication intercellulaire et leur étude semble être une voie prometteuse pour la découverte de biomarqueurs (Mitchell et al., 2015).

L'étude de l'expression des Syncytines-1 et -2 dans les cellules trophoblastiques et les exosomes placentaires issus de femmes enceintes normales ou prééclampsiques a montré une diminution de leur expression. Pour MFSD2a, la comparaison de son expression au niveau des cellules trophoblastiques issues de placentas normaux versus prééclampsiques a montré une diminution de son expression en cas de prééclampsie (Toufaily et al., 2015). On ne sait cependant pas aujourd'hui comment est régulée l'expression de MFSD2a et bien que la Syncytine-2 soit présente à la surface des exosomes, ceci n'a jamais été vérifié pour MFSD2a.

Considérant les informations précédentes, le sujet proposé « Analyse de l'expression du récepteur de la Syncytine-2 (MFSD2a) par l'étude de son promoteur ainsi que sa localisation cellulaire et extracellulaire (exosomes) au niveau placentaire » a pour objectifs de : 1) rechercher et de caractériser les ARNm de MFSD2a dans les lignées cellulaires BeWo, JAR, JEG-3 ainsi que les cytotrophoblastes villosités (CTV), 2) de localiser et caractériser la région promotrice du gène MFSD2a et 3) de détecter la protéine MFSD2a dans les cellules BeWo et CTV ainsi que dans les exosomes placentaires.

Les implications théoriques et appliquées de ce projet sont respectivement, l'approfondissement des connaissances fondamentales sur MFSD2a, sa potentielle implication au niveau placentaire et son rôle éventuel dans la prééclampsie.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Les rétrovirus

Les virus sont des agents infectieux, parasites obligatoires, ne possédant qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) et totalement dépendent des mécanismes cellulaires de leurs hôte pour survivre. Ils infectent tous les types cellulaires et peuvent parfois produire d'importantes modifications cellulaires (Madigan et al., 2006). David Baltimore, prix Nobel de médecine 1975, est l'auteur d'une classification, qui porte son nom, et qui permet de classer les virus en sept groupes selon différentes caractéristiques génomiques (ADN/ARN, sens, nombre de copies, etc.) (Baltimore, 1971).

Les rétrovirus font partie du groupe VI de la classification de Baltimore. Cela signifie qu'ils sont des virus à ARN, possèdent une capsidie icosaédrique enveloppée et une structure génomique comprenant deux molécules d'ARN sens simple brin à polarité positive (Baltimore, 1971). Ils ont une taille d'environ 90 à 120 nanomètres et sont très répandus dans le monde animal. Ils sont la cause de beaucoup de maladies, peuvent induire des cancers, immunodéficience (tel que le SIDA) ou des anémies. Ils sont capables d'infecter beaucoup de types cellulaires différents et leur présence peut avoir un effet nocif à court (quelques semaines) ou à long terme (plusieurs années) (McGuire et al., 1971, De Gruttola et al., 1986).

Le génome des rétrovirus possède une organisation générale de l'ARN viral comme suit (Figure 1.1) : 5' R/U5-*gag-pro-pol-env*-U3/R 3' (Voevodin et Marx, 2009).

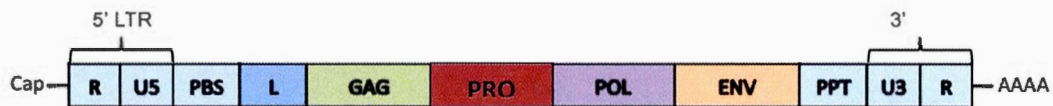


Figure 1.1 Organisation générale de l'ARN d'un rétrovirus.

Les différentes régions sont les suivantes (Cann, 2016) :

R : est une séquence terminale longue répétée aux deux extrémités qui sera la première partie de l'ADNc .

U5 et **U3** : sont les longues séquences répétées correspondant respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARN (Seibert et al., 1995).

PBS (*Primer Binding Site*) et **PTT** : La séquence PBS est une séquence d'attachement de l'ARNt sur l'ARNm. L'ARNt servira d'initiateur pour la rétro-transcription. La séquence PTT est la région nécessaire à l'amorçage de la rétro-transcription du brin (+).

L : cette séquence contient trois différents signaux. Un premier nécessaire à la fixation des ribosomes sur la molécule d'ARN (Patschinsky et al., 1986), le deuxième aide la formation de dimères d'ARN (Dhar et al., 1980) et le troisième est impliqué dans l'encapsulation des ARN viraux (Darlix, 1986).

Gag est un gène codant pour les protéines de structures comme la matrice, capside et nucléocapside.

Pol est un gène codant pour la transcriptase inverse, la ribonucléase H et l'intégrase.

Env est un gène codant pour les protéines d'enveloppe.

Certains rétrovirus, comme le VIH, contiennent des gènes accessoires comme *rev*, *tat*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*, etc, qui les aident à infecter certains types cellulaires ou à se défendre contre le système immunitaire (Cullen and Greene, 1989).

Le cycle réplcatif des rétrovirus est bien particulier, car il nécessite un ADN intermédiaire (Figure 1.2). Comme il a été décrit par Pommier et *al.* (2005), le virus suit plusieurs étapes ; à **l'entrée**, le virus infecte une cellule en fusionnant son enveloppe avec la membrane cellulaire ou avec la membrane de l'endosome tardif s'il a été endocyté (un changement de pH dans l'endosome peut provoquer une modification conformationnelle des protéines d'enveloppe du virus lui permettant alors de fusionner avec la membrane de l'endosome) (Kubo et al., 2012). La capsid se retrouve alors dans le cytoplasme où la **décapsidation** permettra de libérer l'ARN viral. Ce dernier va être ensuite **rétrotranscrit** en ADN grâce à l'activité de l'enzyme virale Transcriptase inverse. Cette étape donne lieu à la production d'un ADN proviral double brin qui va **s'intégrer** dans le génome de la cellule hôte via l'action de la protéine virale appelée Intégrase. Une fois intégré, la **transcription** de cet ADN suivie de la traduction des ARNm viraux permettra la production de diverses protéines (ex : capsid, glycoprotéine d'enveloppe, Transcriptase inverse et Intégrase) qui vont alors être **assemblées** pour former de nouveaux virions. Ces derniers sortiront de la cellule par **bourgeonnement**. C'est lors du bourgeonnement que la particule virale obtient son enveloppe. Elle est constituée de la bicouche lipidique membranaire de la cellule hôte enrichie par les protéines codées par le gène *env*. Une fois sécrétés, les virions devront subir une étape de **maturation** avant d'être fonctionnels et de pouvoir infecter d'autres cellules (Pommier et al., 2005).

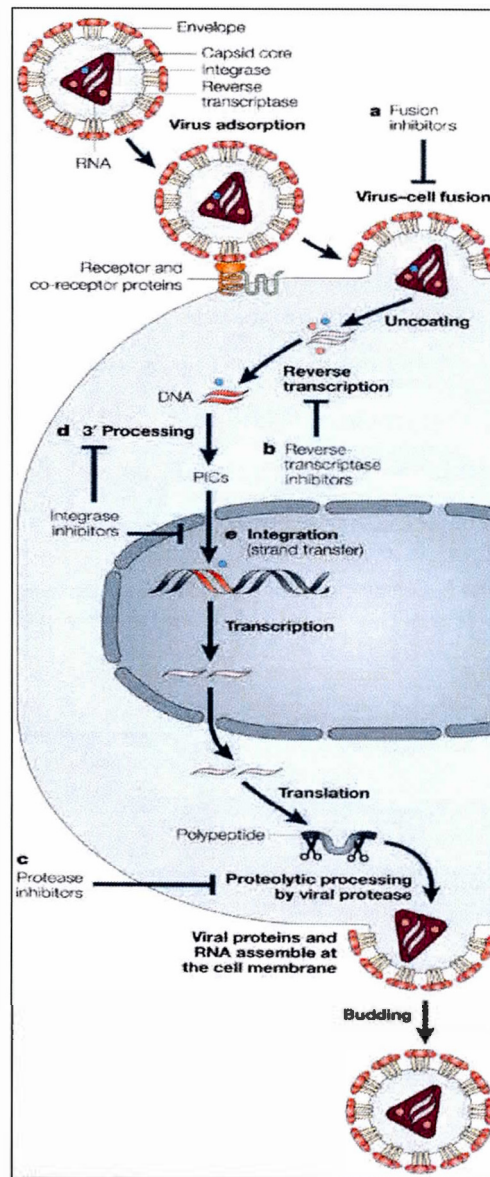


Figure 1.2 Cycle de répllication des rétrovirus (Pommier et al., 2005). Représentation des étapes d'infection, transcription inverse, intégration et répllication dans un cellule. Pour infecter une cellule, un virus va premièrement se fixer à la membrane cellulaire par sa protéine d'enveloppe, spécifique d'un récepteur. L'ARN génomique sera alors libéré dans le cytoplasme, rétrotranscrit en ADN puis migré au noyau et intégré au génome cellulaire. Cela permettra au virus d'utiliser ensuite la machinerie cellulaire de la cellule pour la production de nouvelles particules virales et propager l'infection.

Les protéines d'enveloppe jouent un rôle crucial pour le virus. Codées par le gène *env*, ce sont les protéines responsables de la fixation des virions sur les récepteurs spécifiques. Ces complexes protéiques sont divisés en deux parties principales, la glycoprotéine de surface (SU) qui est l'antigène majeur, et la portion transmembranaire (TM) qui maintient le SU à la surface membranaire (Perez et al., 1992) (Figure 1.3). L'interaction de la SU avec le récepteur membranaire de la cellule hôte va induire un changement de conformation de la portion TM, ce qui expose alors le peptide de fusion et permet son insertion dans la membrane cellulaire, catalysant ainsi la fusion du virion avec la cellule hôte (Flint, 2004).

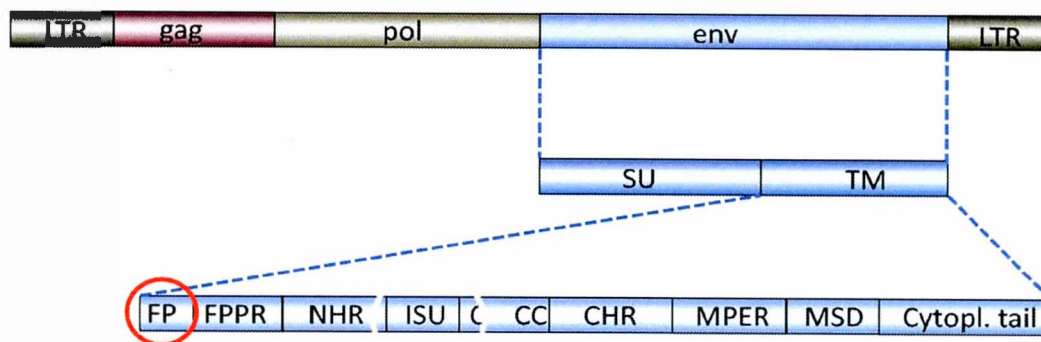


Figure 1.3 Représentation schématique de la séquence intégrée d'un rétrovirus (Denner, 2016). La partie TM de la protéine d'enveloppe se divise en neuf régions : peptide de fusion (FP) (entouré en rouge), région proximale du peptide de fusion (FPPR), région hélicale N (NHR), domaine immunosuppresseur (ISU), boucle cysteine-cysteine (C-CC), région hélicale C terminale (CHR), région membranaire proximale externe (MPER), domaine transmembranaire (MSD) et queue cytoplasmique (Cytopl. Tail).

Parmi les sous unités de la TM, le fragment le plus important est le peptide de fusion (FP). Sans lui, toute l'activité de la protéine d'enveloppe est inhibée car elle ne peut plus jouer son rôle d'initiation de la fusion.

1.2 Les HERV

À la différence des rétrovirus exogènes, qui cherche à intégrer leur matériel génétique dans des cellules spécifiques, les rétrovirus endogènes sont déjà intégrés dans toutes les cellules de l'organisme (Denner, 2016). Grâce au séquençage du génome humain, il a été montré que 45% de notre ADN est composé d'éléments transposables comme les rétroéléments ou les transposons. Cependant, environ 5 à 8% de la totalité de notre génome est constitué de séquences ayant des homologies avec des rétrovirus infectieux et ces séquences sont transmises de génération en génération (van der Kuyl, 2012). L'existence de ces séquences peut être expliquée par le cycle réplcatif des rétrovirus qui possèdent la capacité de s'intégrer dans l'ADN de l'hôte. Il y a des millions d'années, certains rétrovirus ancestraux ont intégré leur ADN viral dans des cellules germinales humaines. Ceci a conduit à une transmission verticale de ces séquences virales d'une génération à l'autre et on parle alors de rétrovirus « endogènes » humains (HERV) (van der Kuyl, 2012) (Figure 1.4). Les HERVs sont divisés en trois classes (I, II et III) (Figure 1.5) et chaque classe contient plusieurs sous-groupes. Ils sont classés en fonction de leur similitude avec différents rétrovirus infectieux. Les HERVs de classe I sont apparentés aux gammarétrovirus, ceux de la classe II sont apparentés aux bétarétrovirus et ceux de la classe III aux spumavirus (van der Kuyl, 2012).

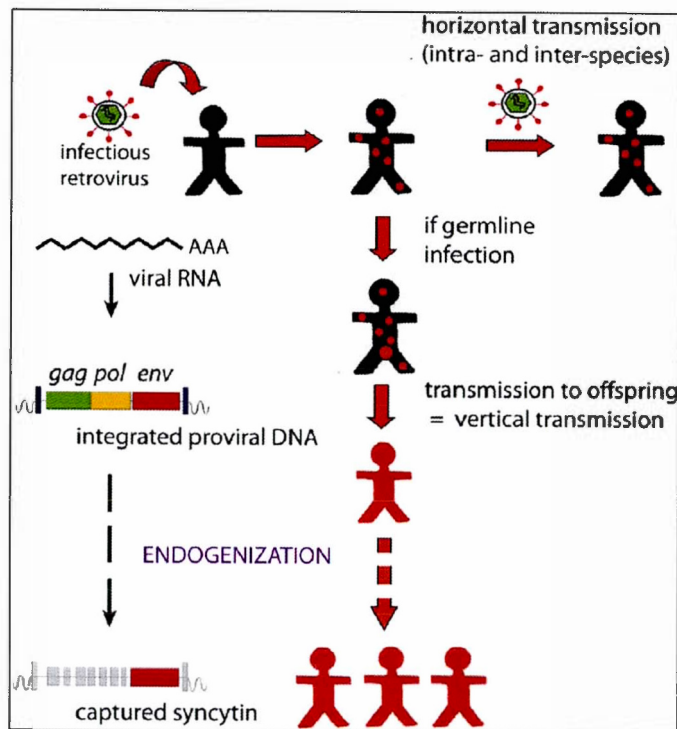


Figure 1.4 Mécanisme d'endogénéisation rétroviral (Dupressoir et al., 2012). Les rétrovirus ont la capacité d'insérer leur matériel génétique dans le génome des cellules infectées. L'infection conduit habituellement à une production de virions qui propagent l'infection, horizontalement, à d'autres individus. Dans de rares occasions, les virus peuvent infecter des cellules de lignées germinales, ce qui conduit alors à une transmission verticale du provirus dans toutes les cellules et donc à son endogénéisation. Au cours de l'évolution, la majorité des gènes ont subi des mutations délétères, mais certains sont toujours fonctionnels, apportant un avantage évolutif, comme les Syncytines au niveau placentaire.

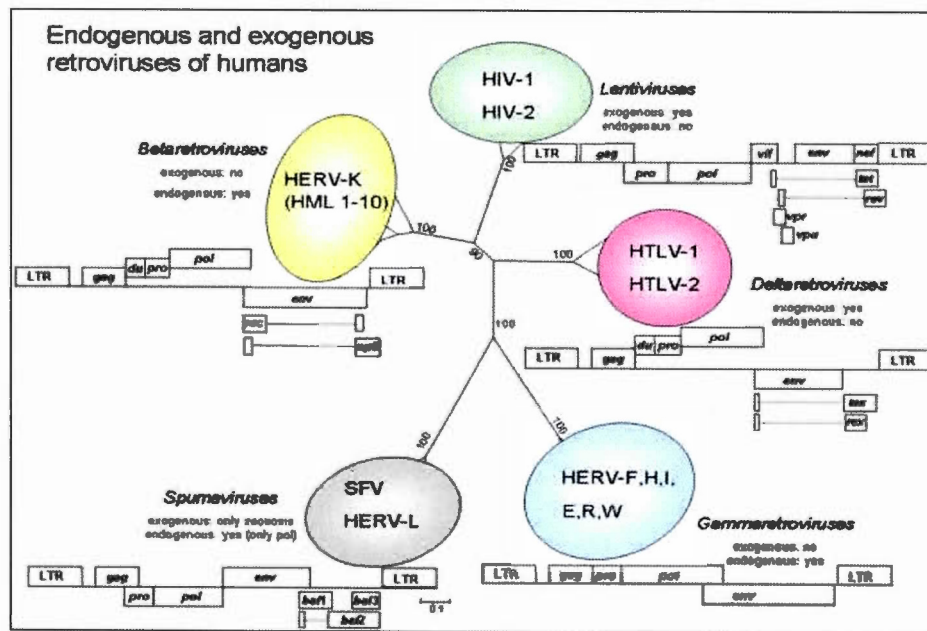


Figure 1.5 Arbre phylogénétique des rétrovirus humains (van der Kuyl, 2012). Représentation des différentes branches de l'arbre phylogénétique des rétrovirus humains présentés avec leurs organisations génomiques type.

Ces virus sont maintenant inactifs. Une accumulation d'altération génétique a fait en sorte que seuls quelques rares éléments sont toujours capables de produire des protéines fonctionnelles (van der Kuyl, 2012). Parmi les protéines conservées, on trouve surtout des protéines d'enveloppe, permettant la fusion de la particule virale avec la cellule cible, qui s'exprimaient autrefois à la surface des particules virales et qui se retrouvent aujourd'hui exprimées à la surface de certaines cellules (van der Kuyl, 2012). La fusion cellulaire débute par l'adhésion cellulaire à l'aide d'une interaction de type ligand-récepteur, formant des faisceaux d'hélices *Alpha* et aidé par des molécules signalétiques (Larsson et al., 2008). Syncytine-1 se lie à son récepteur SLC1A5/ASCT2/RDR, un transporteur d'acide aminé et récepteur rétroviral de type D (Blond et al., 2000a, Malassine et al., 2005). Syncytine-2 se lie à son récepteur MFSD2a (*Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2*) (Esnault et al., 2008).

De la même manière qu'une particule virale fusionnerait avec une cellule, les protéines d'enveloppe Syncytine-1 (HERV-W) et -2 (HERV-FRD), induisent, par leur interaction avec leurs récepteurs, MFSD2a, la fusion des cytotrophoblastes villosus au cours du développement placentaire (Blaise et al., 2003, Renard et al., 2005) (Figure 1.6). Ceci permet la formation d'un syncytium, appelé syncytiotrophoblaste (STB), qui permet les échanges entre la mère et le fœtus (voir détails dans la section 1.3) (Mi et al., 2000) (Chen et al., 2012). Dans le cas de la Syncytine-2, c'est la protéine MFSD2a qui joue le rôle de récepteur. Comme il a déjà été montré par Parseval et Heidmann (2005), le placenta est une zone préférentielle d'expression des HERVs. Bien que les LTR jouent le rôle de promoteur pour l'expression des HERV, les éléments de régulations endogènes voisins peuvent aussi influencer leur expression (Li and Karlsson, 2016). Les HERV peuvent aussi jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes avoisinants (Prudhomme et al., 2005) (voir figure 1.8 et section 1.3).

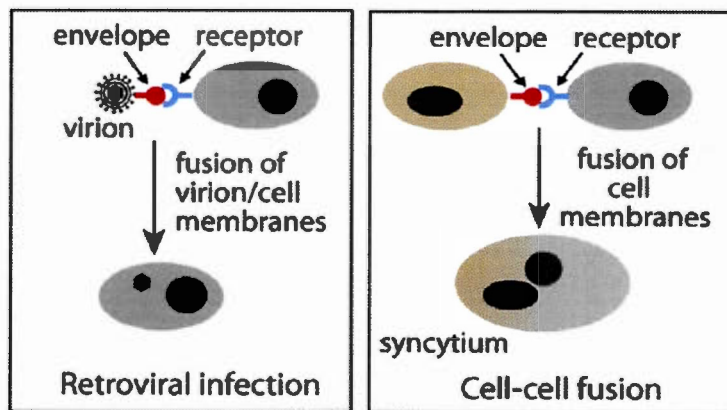


Figure 1.6 Conséquence de l'interaction entre une protéine d'enveloppe et son récepteur : fusion du virion avec sa cellule cible (gauche) ou fusion des cellules formant un syncytium (droite) (Dupressoir et al., 2012).

1.3 Le placenta

Le placenta est un organe transitoire présent uniquement lors de la grossesse et qui assure les échanges métaboliques entre la mère et le fœtus. Il protège aussi le fœtus contre les bactéries et autres substances toxiques. Le placenta croît jusqu'à la 36^e semaine, d'abord par hyperplasie puis par hypertrophie des cellules du trophoblaste (Roberts et al., 2016). À terme, il forme un disque d'environ 22 cm de diamètre pour 2,5 cm d'épaisseur pesant environ 500g (Burton and Fowden, 2015). Il possède deux faces, une fœtale (ou chorale) avec une bordure en brosse et une basale rattachée à la paroi utérine (Ganapathy et al., 2000). La chambre intervillieuse et les villosités chorales se localisent entre ces deux faces (Figure 1.7). Elles sont considérées comme les unités structurales et fonctionnelles du placenta humain et peuvent atteindre une surface de 14 m² au terme d'une grossesse normale (Burton and Fowden, 2015).

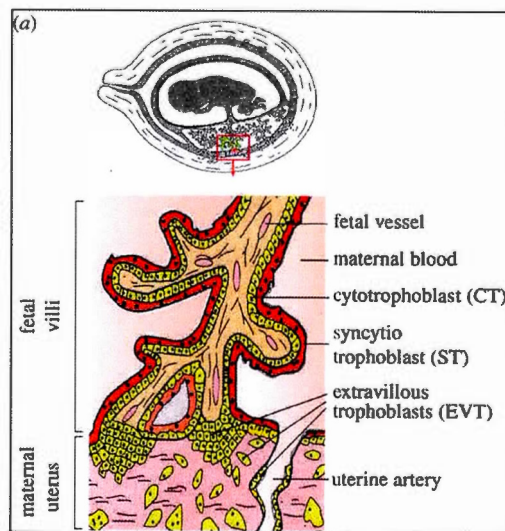


Figure 1.7 Schéma de l'unité meterno-fœtale et de la villosité chorale (modifié à partir de (Lavialle et al., 2013)).

Selon Burton et Fowden (2015), la villosité chorale n'est constituée dans sa structure définitive que vers la troisième semaine après la fécondation. Une première

vague proliférative de cytotrophoblastes va coloniser le syncytiotrophoblaste interlacunaire formant alors l'ébauche de la villosité chorale. Les colonnes de cytotrophoblastes seront à leur tour envahies par une prolifération mésenchymateuse d'origine embryonnaire, ce qui permettra la croissance de la villosité.

Le placenta assure cinq fonctions qui sont essentielles au développement fœtal: 1) respiratoires par les échanges gazeux, 2) nutritionnelles par le transport de métabolites et d'ions, 3) excrétoires par le transport des déchets, 4) endocrines par la production d'hormones et 5) immunologiques. Il permet la greffe semi-allogénique du fœtus en étant l'intermédiaire entre deux systèmes immunitaires (Simpson et al., 1992, Faber, 1993). Toutes ces fonctions sont modulées par la qualité du syncytiotrophoblaste qui se forme et se renouvelle par la fusion des cytotrophoblastes (Larsson et al., 2011). Cette fusion est possible grâce à la présence de protéines fusogéniques faisant partie de la famille des HERV : les Syncytines-1 et -2 (HERV-W et HERV-FRD) (Blond et al., 1999; Blaise et al., 2003). La Syncytine-2 possède aussi un potentiel immunosuppresseur qui pourrait protéger le fœtus contre le système immunitaire de la mère (Mangeney et al., 2007).

La prééclampsie (PE) est une complication obstétricale fréquente, multisystémique qui touche 2 à 10% des femmes (Foucade et al., 2014). Elle se définit par l'apparition d'un épisode d'hypertension artérielle persistant avec une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg et une protéinurie supérieure à 0,3g par jour. Dans certains cas, elle peut évoluer en éclampsie et mettre alors en danger la vie de la mère ou de l'enfant (Foucade et al., 2014). La cause de cette maladie n'est pas connue. Elle touche les femmes souvent après 20 semaines de grossesse. La maladie peut également survenir plus tardivement, peu de temps avant l'accouchement ou parfois même après l'accouchement (Foucade et al., 2014). De manière intéressante, un défaut d'expression des Syncytines a été associé à la prééclampsie et il a été montré que la diminution de l'expression des Syncytine-1 et

-2 est proportionnelle à la sévérité de la prééclampsie (Vargas et al., 2011, Knerr et al., 2002, Acién et al., 1990, Chen et al., 2006, Keith et al., 2002). Notons que la production d'ARNm ou de protéine codant pour MFSD2a est aussi diminuée en cas de prééclampsie sévère (Toufaily et al., 2013).

L'utilisation de certains produits comme la forskoline (FSK) ou bpV[pic] sur des cellules a pour impact de modifier la cascade enzymatique contrôlant la transcription. La FSK inhibe l'adényle cyclase qui va avoir pour effet de diminuer le niveau d'AMPc intracellulaire (Khanum and Dufau, 1986). Le bpV[pic] est un inhibiteur de la protéine phosphatase (Vargas et al., 2008). Il a été démontré que des cellules BeWo traitées avec la FSK et le bpV[Pic] montrent une augmentation des niveaux d'ARNm codant pour les Syncytine-1 et -2 (Vargas et al., 2008). Dans le cas de la Syncytine-2, le traitement des cellules BeWo avec la FSK induit la liaison des facteurs de transcriptions JunD et CREB2 sur un motif CRE/AP1-like situé dans la région promotrice de la Syncytine-2 (Figure 1.8) (Toufaily et al., 2015). En plus de l'expression des Syncytines, il a été montré que MFSD2a est nécessaire à la fusion des cellules BeWo et que le traitement à la FSK induit l'expression de MFSD2a (Toufaily et al., 2013, Toufaily et al., 2015). Comme il a déjà été montré que GCM1, un facteur placentaire, induisant l'expression de Syncytine-2 et MFSD2a, il est intéressant de vérifier si d'autres similitudes existent (Liang et al., 2010). Lors de leurs expériences, Liang et al, (2010) ont montré que GCM1 est un facteur de transcription qui permet l'expression de Syncytine-2 et MFSD2a dans des cellules MCF-7, qui ne les expriment normalement pas. Mennant ainsi à la fusion des MCF-7 (Liang et al., 2010).

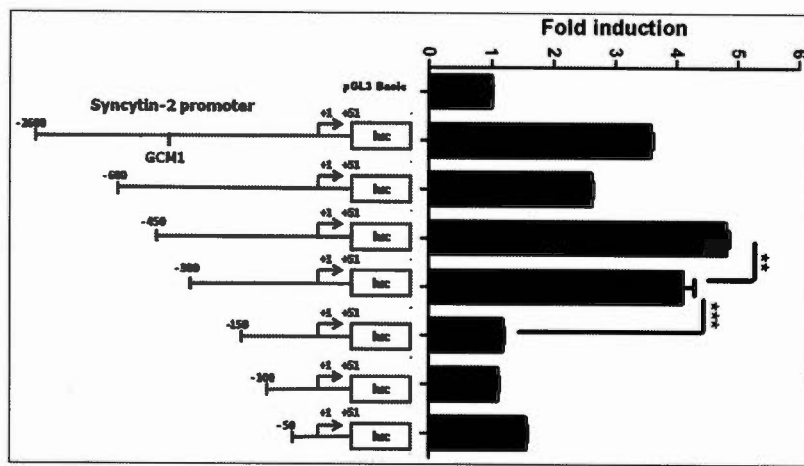


Figure 1.8 Identification de la région promotrice de Syncytine-2 répondant à la forskoline dans les cellules BeWo (Toufaily et al., 2015). Les régions promotrices +450 à +51 et +300 à +51 possèdent les éléments de régulation les plus sensibles à la forskoline.

1.4 Les promoteurs génomiques

Un promoteur génomique est une région de l'ADN qui a pour fonction de réguler l'expression d'un gène. Il en existe différents types, mais ont tous pour fonction de lier une ARN polymérase. C'est la polymérase II qui va transcrire depuis l'ADN un ARNm (Pedersen et al., 1999). Afin de réguler l'expression des gènes, ces régions promotrices vont être capable de lier des protéines appelées facteurs de transcription généraux (GTFs) qui vont interagir avec la polymérase pour augmenter le niveau de transcription. Les GTFs les plus importants sont TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF et TFIIH (Burke and Kadonaga, 1997) (Figure 1.9).

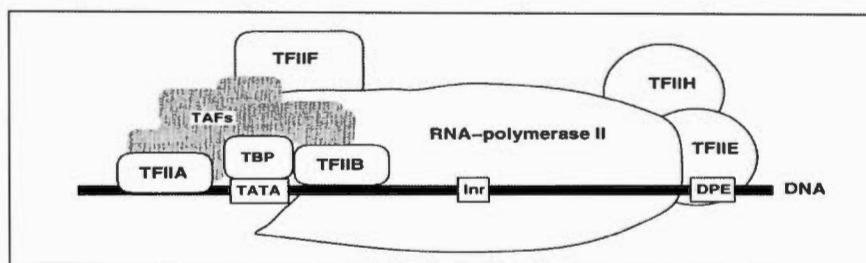


Figure 1.9 Promoteur minimal complexé avec l'ARN polymérase II et les GTFs montrant les éléments de régulations : Boîte-TATA, Inr et DPE (Burke et Kadonaga, 1997).

Un promoteur minimal est une séquence capable de lier et d'assembler un complexe de pré-initiation déterminant ainsi le site d'initiation de transcription (TSS) (Fassler and Gussin, 1996). Une classe importante de promoteur minimal est basée sur la présence de boîte-TATA qui dirige l'initiation de la transcription environ 30 nucléotides en aval. Le consensus pour la séquence d'une boîte-TATA est TATAAAA (Hahn et al., 1989, Singer et al., 1990). Il existe une seconde classe de promoteurs minimaux ne possédant pas de boîte TATA dont la régulation se fait par un élément d'initiation (Inr) au niveau du TSS. Ces promoteurs sont cependant plus faibles que ceux contenant une boîte-TATA (Smale, 1997). Il existe aussi différentes combinaisons de ces promoteurs. Les *Downstream Promoter Element* (DPE) sont des éléments de régulation en aval du TSS, analogue à une boîte TATA qui ont pour fonction de lier TFIID et participer à la formation du complexe de pré-initiation (Burke and Kadonaga, 1996). Il existe d'autres éléments de régulation, tels que les amplificateurs, pouvant activer la transcription par la stimulation des promoteurs. Il est intéressant de noter que, contrairement aux promoteurs, la structure de la chromatine permet d'avoir des amplificateurs placés très loin, jusqu'à plusieurs centaines de milliers de paires de bases, de leur promoteur cible (Banerji et al., 1981). Ceux situés à proximité des promoteurs seront dits proximaux, les autres seront dits distaux (Pedersen et al., 1999). Les amplificateurs sont des régions régulatrices de l'ADN liant, dans certaines conditions, des facteurs de transcriptions qui vont, par

repliement de la chromatine, agir sur les promoteurs et stimuler l'expression d'un gène. Suivant les conditions, un même gène peut sous l'action de différents amplificateurs et ainsi réguler finement l'expression d'un gène (He et al., 2014). Il a récemment été montré que les amplificateurs peuvent aussi avoir une activité promotrice modérée (Kim et al., 2010). Les relations amplificateur/promoteur sont rigoureusement régulées par les facteurs de transcriptions qui s'y lient, eux même limités par l'accessibilité de la chromatine (Chen and Dent, 2014). Il a été estimé que quelques pour cent du protéome cellulaire se destinent à la régulation de l'expression génique (Pedersen et al., 1999).

1.5 MFSD2a

MFSD2a un symporteur de lysophosphatidylcholine (LPC) dépendant du sodium. Le LPC est un lipide formé d'une choline, un phosphate, un glycérol et deux acides gras (qui peuvent être des longues chaines d'acides gras). Ils forment ainsi des composés lipidiques complexes, importants pour le développement, la croissance, les fonctions motrices et le métabolisme lipidique, comme la lyse des tissus adipeux bruns par l'activation de la voie β AR (Berger et al., 2012, Angers et al., 2008). MFSD2a est exprimé dans beaucoup tissus comme, le cerveau, les yeux, le foie, les poumons, les intestins, les testicules et biensûr, le placenta (Figure 1.10 et 1.11) (Uhlen et al., 2015, Wong et al., 2016).

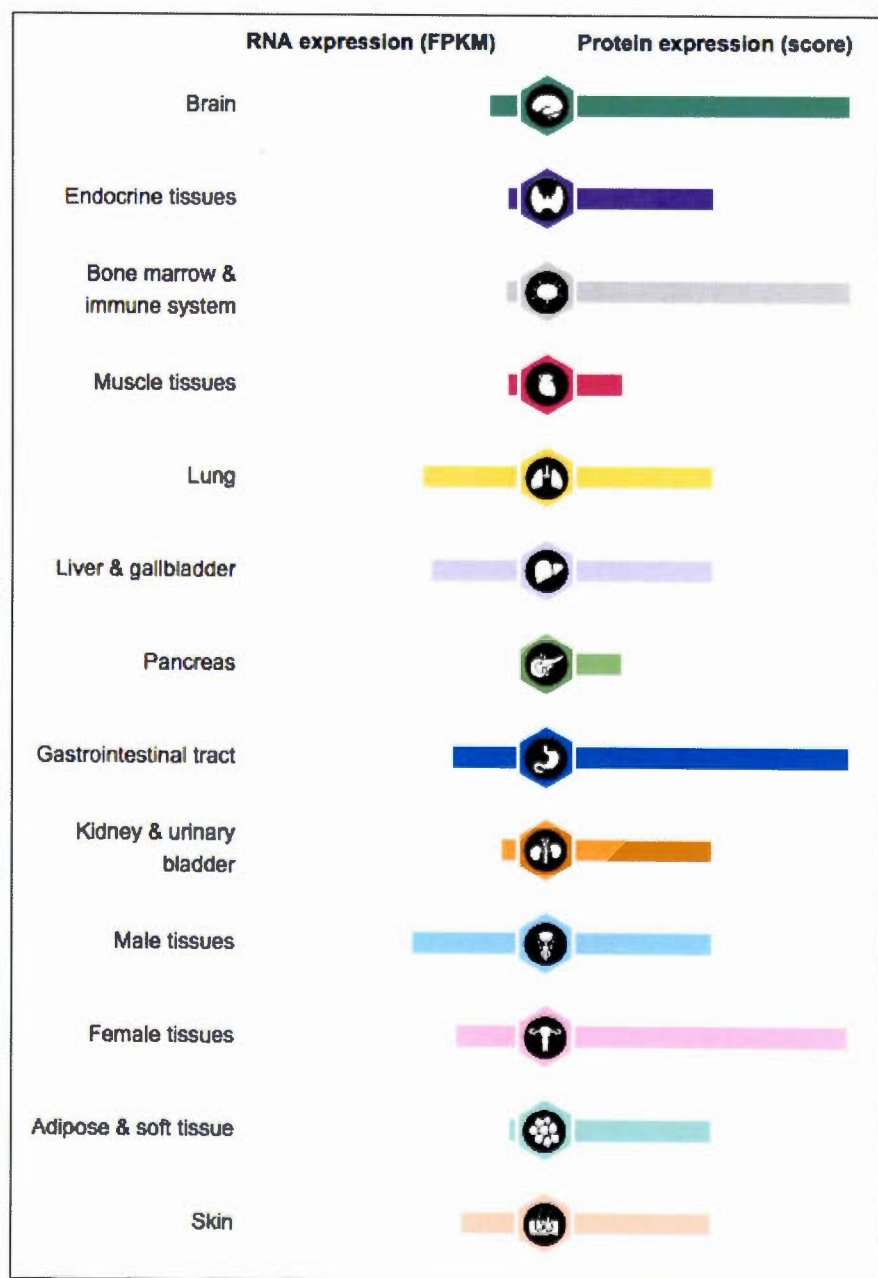


Figure 1.10 Niveau d'expression des ARNm et protéique de MFSD2a dans différents tissus (Uhlen et al., 2015).

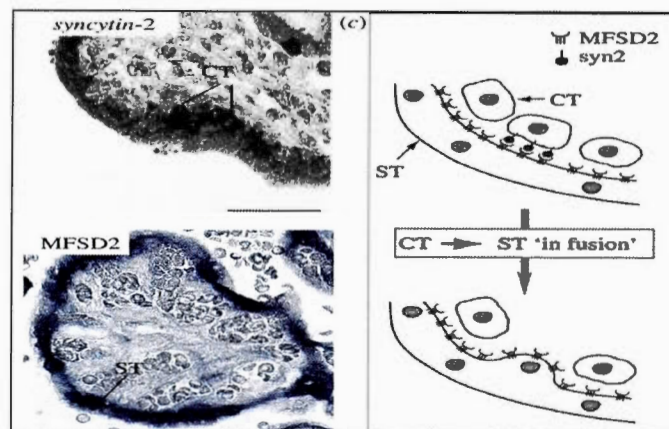


Figure 1.11 Analyse *in situ* de section de villosités choriales humaines pour l'expression de Syncytine-2 et MFSD2a. Adapté de (Esnault et al., 2008). Abréviations : ST – Syncytiotrophoblastes et CT – Cytotrophoblastes.

Le gène codant pour MFSD2a a été identifié en 2008 (Angers et al., 2008). L'expression de ce gène peut varier, exprimé dans la plupart des régions du cerveau, ou bien exprimée seulement dans certaines régions d'autres tissus tels que le foie (Berger et al., 2012). MFSD2a est une protéine membranaire formant deux isoformes (543aa et 530aa) et possédant respectivement onze et dix domaines transmembranaires (Figure 1.12) (Uhlen et al., 2015). Un troisième isoforme de 458 aa avec sept domaines transmembranaires a été prédit, mais aucune confirmation expérimentale n'a permis de vérifier cette prédiction.

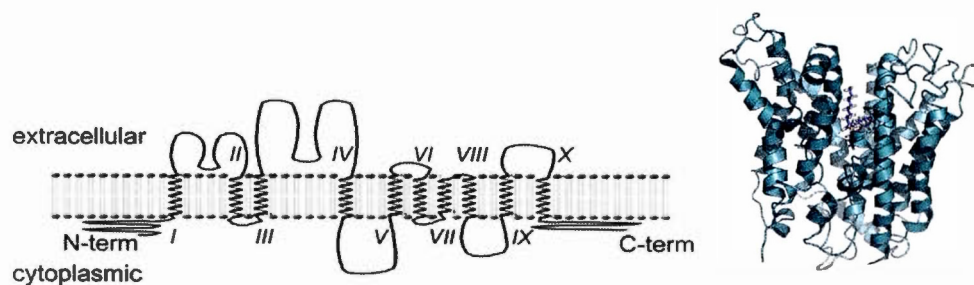


Figure 1.12 Domains transmembranaires et représentation 3D de l'isoforme 2 de MFSD2a (530 aa) (Esnault et al., 2008, Ben-Zvi et al., 2014).

Il existe déjà quelques informations concernant MFSD2a, et certaines relations sont illustrées dans la figure suivante, montrant des liens directs, similarité ou partenaires d'interaction de MFSD2a. Il n'y a cependant que peu d'information au niveau placentaire (Liang et al., 2010, Delidaki et al., 2011, Ruebner et al., 2010, Spinola et al., 2007) (Figure 1.13).

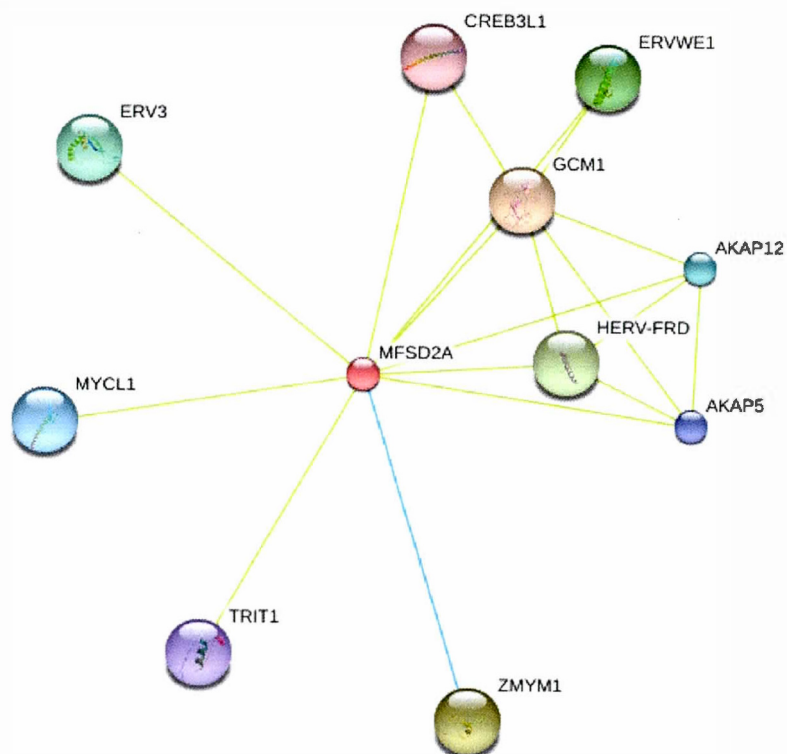


Figure 1.13 Schéma des interactions connues avec MFSD2a. Généré à partir de String90.embl.de. Contrairement aux Syncytines, MFSD2a reste très peu étudiée au niveau placentaire, bien qu'il est évident que son rôle de récepteur est majeur dans la formation et le maintien du syncytiotrophoblaste. Abréviations : ERV3 – Endogenous retroviral sequence 3, CREB3L1 – cAMP responsive element binding protein 3, ERVWE1 – Syncytine-1, GCM1 – Glia cell missing homolog 1, AKAP12 et 5 – A kinase anchor protein et HERV-FRD – Syncytine-2.

Parmi ces protéines, certaines ont des relations intéressantes avec MFSD2a, comme :

- HERV-FRD – Syncytine-2, le ligand direct de MFSD2a au niveau placentaire.

- ERV3 – *Endogenous Retroviral Sequence 3*, est une protéine d'enveloppe rétrovirale structurellement proche de Syncytine-2 ayant perdu sa fonction fusogénique.
- CREB3L1 – *cAMP responsive element binding protein 3*, qui se lie aux séquences CRE-like et active la transcription.
- GCM1 – *Glia cell missing homolog 1*, est un facteur de transcription placentaire nécessaire au développement placentaire en se liant spécifiquement au « trophoblast-specific element 2 (TSE2) ».
- AKAP12 et 5 – *A kinase anchor protein*, sont des protéines d'ancrage de kinases actives dans la cascade enzymatique de l'AMPc et des protéines kinases A et C.

Dans le placenta, en plus de ses fonctions habituelles, MFSD2a joue le rôle très important de récepteur de la Syncytine-2, permettant ainsi la formation du STB (Esnault et al., 2008, Toufaily et al., 2013). Il est intéressant de noter que l'expression ectopique de Syncytin-2 induit la fusion cellulaire et que cette fusion peut être augmentée en induisant l'expression de MFSD2a par la forskoline (Blond et al., 2000b, Toufaily et al., 2015). En 2010, l'équipe de Chen s'est intéressée à la méthylation et l'activité des promoteurs de Syncytine-2 et MFSD2a dans plusieurs lignées cellulaires (BeWo, trophoblastes, HEK293T) et tissu placentaire. Ils ont constaté que les îlots CpG du promoteur de Syncytine-2 sont fortement méthylés dans les cellules 293T, mais déméthylés dans les cellules placentaires. Ceci indiquerait que la régulation de l'expression du gène se fait par condensation de la chromatine. Il est intéressant de noter que GCM1 augmente significativement l'expression relative de

Syncytine-2 et MFSD2a en déméthylant et activant les régions promotrices (Yamada et al., 1999, Liang et al., 2010).

1.3 Les exosomes

Le placenta, bien qu'étant un organe transitoire, produit une abondance de microvésicules, dont des exosomes. Il a été montré que le nombre d'exosomes placentaires augmente significativement dans le plasma maternel au cours du premier trimestre de grossesse (Sarker et al., 2014). Rappelons que les exosomes sont des microvésicules d'environ 40 à 100 nm d'une densité comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml, libérés par différents types cellulaires et retrouvés dans une grande majorité des fluides humains (Cocucci et al., 2009). Leur biogenèse commence par la formation d'un endosome précoce. Il se développera en endosome tardif suite à sa maturation, caractérisée par la formation de vésicules intraluminales (VILs) dans la lumière de celui-ci. Le processus de formation des VILs semble être dirigé par les protéines SNARE et GTPases. Les VILs mesurent entre 40 à 100nm de diamètre et englobent des portions du cytosol et incorporent des protéines périphériques transmembranaires. Ceci mène à la formation des corps multivésiculaires (CMVs) (Keller et al., 2006). Il existe deux issues pour les CMV : soit ils fusionnent avec un lysosome, ce qui va conduire à la dégradation de leur contenu, soit ils fusionnent avec la membrane plasmique et libèrent alors les VILs dans le milieu extracellulaire (Keller et al., 2006). Ces vésicules seront alors appelées exosomes (Johnstone et al., 1987) (Figure 1.14).

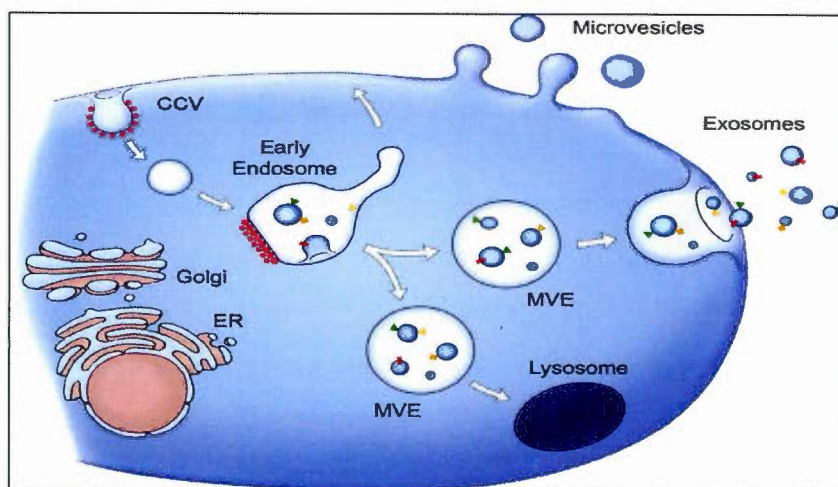


Figure 1.14 Biogenèse des exosomes. Modifié à partir de (Qin and Xu, 2014).

Le mot exosome a été utilisé pour la première fois en 1987 (Johnstone et al., 1987) et il a aujourd'hui été montré que ces derniers participent à plusieurs activités physiologiques ou pathologiques (Sato et al., 2016, Katakowski and Chopp, 2016, Kholia et al., 2016). Ils sont retrouvés dans plusieurs fluides corporels, tels que le sperme (Madison et al., 2014), le sang (Caby et al., 2005), l'urine (Bruschi et al., 2016), la salive (Chaparro et al., 2016), le lait maternel (Admyre et al., 2007), le liquide amniotique (Asea et al., 2008), le liquide céphalorachidien (Andre et al., 2002) et autres. Ils se sont révélés essentiels pour la communication intercellulaire et interviennent dans des processus aussi variés que la lactation (Mincheva-Nilsson and Baranov, 2010), la réponse immunitaire (Kosaka et al., 2010), la fonction neurale (Pusic et al., 2016), les maladies dégénératives (Van Giau and An, 2016), les cancers (Qin et al., 2016), l'infection virale (Kalamvoki and Deschamps, 2016) ou le développement placentaire (Tooi et al., 2016). Les exosomes contiennent différents composés biologiquement actifs tels que des protéines, des lipides ou divers ARN (Katakowski and Chopp, 2016). La présence récurrente de certaines protéines à la

surface des exosomes (CD9, CD63, CD81, CD82, TSG101, HSP70 ou HSP90) aide à identifier ces vésicules (Katakowski and Chopp, 2016).

Il est admis aujourd'hui que les exosomes placentaires sont importants pour la placentation et le développement de la vascularisation materno-fœtale. Ils sont identifiables par la présence de marqueurs comme la « Placental Alkaline Phosphatase » (PLAP) à leur surface (Salomon et al., 2014). Les Syncytines sont aussi un élément important de la membrane des exosomes. Il a été démontré que les exosomes de femmes prééclampsiques ont moins de Syncytine-1 et -2 à leur surface (Vargas et al., 2014). Il est intéressant de noter que les exosomes placentaires se retrouvent dans la circulation sanguine et la salive et qu'ils peuvent être identifiés et que certains ont déjà cherché à les utiliser comme marqueur précoce de pré-éclampsie par des marqueurs comme sFlt-1 ou le ratio PLAP/CD63 (Chaparro et al., 2016). Bien que quelques études aient commencé, ni le contenu ni l'impact des exosomes placentaires sur le fœtus et/ou la mère n'ont été clairement établis. Les exosomes n'en restent pas moins une des classes de vésicules extracellulaires les plus étudiées et prometteuses en tant que biomarqueurs et outils thérapeutiques (Mitchell et al., 2015).

CHAPITRE II

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

À ce jour, aucune donnée n'est disponible sur la régulation de la région promotrice du gène *MFSD2a* et aucune étude ne s'est intéressée à l'expression de la protéine MFSD2a dans les exosomes placentaires. Afin d'apporter de nouvelles connaissances sur l'expression de cette protéine, essentielle pour le bon fonctionnement du placenta, les hypothèses de recherche associées à ce projet sont les suivantes :

Hypothèse 1 : La transcription du gène MFSD2a est dépendante de l'activation de son promoteur qui est sensible à la forskoline.

Objectif 1 : Identifier les régions promotrices qui induisent ou répriment l'expression de MFSD2a ainsi que les facteurs de transcriptions associés en présence de forskoline.

Hypothèse 2 : La protéine MFSD2a est associée à la membrane cellulaire ainsi qu'à celle des exosomes.

Objectif 2 : Vérifier le caractère membranaire de la protéine MFSD2a dans les cellules et les exosomes placentaires associés.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODOLOGIE

Afin de réaliser ce projet, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées. Les lignées cellulaires humaines : HEK293T (Human Embryonic Kidney 293) et son équivalent chez le singe : COS-7 (CV-1 in Origin carrying SV40). Bien que non placentaires, elles ont l'avantage d'être très faciles à manipuler et à transfecter. Elles contiennent le grand antigène T du virus *SV40* qui permet la réplication des plasmides contenant l'origine de réplication de SV40. Les cellules JEG-3, JAR et BeWo sont des bons modèles placentaires souvent utilisés, car elles sont issues de choriocarcinomes, tumeurs malignes rares qui se développent dans l'utérus à partir du placenta. L'isolement des CTV a été effectué selon la technique décrite par Le Bellego et al. (2009). Brièvement, il commence par le lavage du tissu avec une solution saline (0,9% NaCl) puis le grattage de la face maternelle du tissu. Il s'ensuit alors quatre digestions successives du tissu par la trypsine et la DNase I. Une fois les cellules récupérées, elles seront séparées selon leur densité sur un gradient de Percoll[®] afin de récupérer uniquement les CTV. Les lignées cellulaires sont mises en culture dans les milieux suivants : HEK293T et COS-7 dans DMEM, BeWo dans HAM'S F12, JAR dans RPMI et JEG-3 dans EMEM. Les CTV sont mis en culture dans du DMEM avec antibiotique (Penicilline-Streptomycine-Neomycine), HEPES 25mM. Tous ces milieux seront supplémentés de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et sans exosomes (retirés par ultracentrifugation de 12h à 100 000g).

Les cellules sont maintenues en culture à 37°C, 5% CO₂ et 95% d'humidité relative (Le Bellego et al., 2009).

3.1 Recherche et caractérisation des ARN de MFSD2a dans les cellules BeWo, JAR, JEG-3 et CTV

3.1.1 Extraction des ARN totaux des cellules HEK293T, BeWo, JAR, JEG-3 et CTV

Afin d'extraire les ARN totaux des cellules, elles ont été maintenues en culture jusqu'à confluence. Elles ont alors été récoltées et l'ARN a été extrait grâce au *TRIzol*® *RNA isolation reagent* (ThermoFisher™) selon les instructions du fournisseur. Le dosage des ARN a été fait à l'aide du *NanoDrop 2000* selon les instructions du fournisseur (ThermoFisher™).

3.1.2 Détection des ARNm codants pour MFSD2a

Les ARN totaux (5 µg) ont été convertis en ADNc par rétrotranscription (RT) à l'aide d'amorce poly-T (5' TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'), avec une unité de la SuperScript® II de ThermoFisher™ dans un tampon adapté (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂). Il s'en est suivi une réaction de polymérase en chaîne (PCR) avec une unité de la Vent® DNA Polymerase dans le tampon ThermoPol® (20 mM Tris-HCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 0.1% Triton® X-100 à pH 8.8 à 25°C) de *New England Biolabs*® pour 50µl de réaction en utilisant des amorces nichées dans les exons 9 et 11 selon les instructions des fournisseurs avec les amorces MFSD2a Sens et MFSD2a Antisens (Tableau III.I). Afin d'amplifier la β-Actine, une réaction de PCR a été utilisée comme contrôle positif avec les amorces décrites dans le tableau III.I (β-Actine sens et β-Actine Antisens). Les réactions de PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes puis 32 cycles de trois étapes i) dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, ii) appariement à 60,5°C pendant 30

secondes, iii) élongation à 72°C pendant 1 minute et enfin une extension finale à 72°C pendant 7 minutes.

Tableau III.1 Condition de PCR et amorces pour la détection des ARNm codants et les clonages de la région promotrice de MFSD2a.

<u>Amorces</u>	
MFSD2a Sens	5'-CTCCTGGCCATCATGCTCTC-3'
MFSD2a Antisens	5'-GGCCACCAAGATGAGAAA-3'
B-Actine Sens	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
B-Actine Antisens	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
-2404 Sens (KpnI)	5'-GCGCGGTACCCGACAGGCTGGAATAAGCAAGATGACA-3'
-1402 Sens (KpnI)	5'-GCGCGGTACCGGGCTGCAAGGGAGCTTAGCTAACC-3'
-402 Sens (KpnI)	5'-GCGCGGTACCTCTAGGCTTGAAGAAGGAGAGAGGCCCG-3'
+42 Antisens (HindIII)	5'-GCGAAGCTTTAGCCAAGCCGGCTGGCAGACGAGGAA-3'
-1402 Antisens	5'-GGTTAGCTAAGCTCCCTTGACAGCCC-3'
-1209 Sens	5'-TGTGACCATCTGGGGCAGATAGACC-3'
-997 Sens	5'-GGCATCCGTGCCTGCCTTCT-3'
-798 Sens	5'-GCAGGGCTGTTGAGAGCAACTGC-3'
-600 Sens	5'-AGGCCACTGTTGTCATAGTGTACTAGCGG-3'
Mutant A Sens	5'-GAACTATAAGAGGCGAGGGG-3'
Mutant A Antisens	5'-GTTAGCTAAGCTCCCTTGACAGCCC-3'
Mutant B Sens	5'-GAACTATAAGAGGCGAGGGG-3'
Mutant B Antisens	5'-GACGTACGCTGACACTTCCCTCC-3'
Mutant C Sens	5'-GCTTGAAGAAGGAGAGAGGCCCTCC-3'
Mutant C Antisens	5'-GTTAGCTAAGCTCCCTTGACAGCCC-3'

3.1.3 Vérification de la position du site d'initiation de la transcription

À partir d'ARNm totaux (5µg) de HEK293T, une amplification rapide d'extrémités 5' des ADNc par réaction en chaîne par polymérase (RACE) a permis de vérifier le TSS avec le kit : *5'/3' RACE kit, 2nd Generation* de la compagnie Roche™, utilisé selon les instructions du fournisseur.

Le 5' RACE s'effectue en 5 étapes : 1) synthèse d'un premier brin d'ADNc dans le tampon *cDNA Synthesis Buffer* (*cDNA Synthesis Buffer* 5x : 250mM Tris-HCl, 40mM MgCl₂, 150 mM KCl, 5mM dithiothreitol, pH 8,5), par RT avec une unité de transcriptase inverse fournie dans le kit, avec une amorce complémentaire de l'ARNm (5' CGTTCAGTGCTTTGGAGGAT 3'), 2) purification de l'ADNc par le kit de purification de PCR de la compagnie *BioBasic* selon les informations du kit de 5'RACE, 3) ajout d'une queue poly-A à l'extrémité 5' de l'ADNc par une unité de la « Terminal Transferase, recombinant » dans le tampon *Reaction buffer* (*Reaction buffer* 10x : 100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3) 4) amplification de l'ADNc par la queue poly-A par PCR, avec une unité de la polymérase Vent® (voir 1.b.), en utilisant une amorce Oligo(dT)-Ancre et une seconde amorce nichée (5' CCTTCTCCTTTGGCCATGA 3') dans l'ADNc dans le tampon *Reaction buffer* et 5) deuxième PCR, avec une unité de la polymérase Vent® (voir 3.1.2), sur le produit de PCR précédent avec une amorce liant l'ancre et une autre amorce nichée dans le fragment synthétisé précédemment (5' GTAGACGGGATGCTCCTCTG 3') dans le tampon *Reaction Buffer*. Ces fragments, avec leurs extrémités franches, ont été clonés dans le plasmide pJet1.2/*blunt* grâce au kit CloneJET PCR Cloning de ThermoFisher™ selon les instructions du fournisseur. Le plasmide pJET1.2/*blunt* est un plasmide ouvert avec des extrémités franches qui possède son site de clonage multiple au milieu d'un gène suicide (codant pour l'enzyme *eco47IR*). Si un fragment s'insère, il va alors bloquer l'expression du gène suicide et permettre à la bactérie de survivre. Les bactéries utilisées pour la transformation bactérienne sont des *E. Coli* DH5α compétentes. L'ADN plasmidique des bactéries a été extrait à l'aide d'un kit *EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps* de la compagnie BioBasic. Les ADN extraits ont été séquencés par la méthode de Sanger à l'aide des amorces *pJETF* (5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3') et *pJETR* (5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3') (Sanger and Coulson, 1975) à la plateforme de séquençage et génotypage (CRCHUL) de l'Université Laval.

3.2 Localisation et caractérisation de la région promotrice du gène MFSD2a

3.2.1 Clonage des régions en amont du gène MFSD2a dans le plasmide pGL3-Basic

Les régions en amont du gène ont été choisies arbitrairement en fonction des régions riches en GC pour cloner des fragments jusqu'à 2400 nucléotides maximum. Elles ont été clonées dans pGL3-Basic, en amont du gène luciférase, afin de déterminer dans quelle région se situe la région promotrice. Pour cela, les régions -2404 à +42, -1402 à +42 et -402 à +42 ont été amplifiées par PCR avec des amorces comportant les sites de restrictions HindIII et NheI afin d'orienter le clonage du fragment dans pGL3-Basic (Voir Tableau III.I pour les amorces).

Les clones comportant les régions -1209, -997, -798 et -600 à +42 ont été créés par délétion de la région non désirée à partir du clone -1402 à +42 (Voir Tableau III.I pour les amorces). L'amorce -1402 Antisens a été utilisée dans tous les mutants avec l'amorce sens correspondant au fragment désiré (-1209 Sens, -997 Sens, -798 Sens et -600 Sens). Les clones obtenus ont été séquencés par la méthode de Sanger à l'aide des amorces *RVprimer3_primer* (5' CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3') et *LucNrev_primer* (5' CCTTATGCAGTTGCTCTCC 3') (Sanger and Coulson, 1975) à la plateforme de séquençage et génotypage (CRCHUL) de l'Université Laval.

Pour construire le mutant A et isoler la région -2404 à -1402, un mutant de délétion a été réalisé à partir du plasmide contenant la région -2404 à +42 avec les amorces Mutant A sens et Mutant A antisens (Tableau III.I). Pour construire le mutant B et isoler la région -1402 à -402, un mutant de délétion a été réalisé à partir du plasmide contenant la région -1404 à +42 avec les amorces Mutant B sens et Mutant B antisens (Tableau III.I). Pour construire le mutant C et associer les région -2404 à -1402 et -402 à +42, un mutant de délétion a été réalisé à partir du plasmide

contenant la région -2404 à +42 avec les amorces Mutant C sens et Mutant C antisens (Tableau III.I) retirant ainsi le fragment -1402 à -402. Après excision de ces fragments, les plasmides ont été ligués avec la *T4 DNA Ligase* de la compagnie *New England Biolabs®*, selon les instructions du fournisseur.

Le plasmide « S2 » dans la partie Résultats fait référence au plasmide pGL3Basic avec la région -450 à +51 du promoteur Syncytine-2, inséré devant le gène rapporteur luciférase (Toufaily et al., 2015).

3.2.2 Transfection des différentes constructions dans les cellules HEK293T, BeWo, JAR, JEG-3 et CTV

Un (1,0) µg de la construction étudiée, et 0,2 µg du plasmide contrôle (pRc-Actin-LacZ) ont été transfectées dans les cellules HEK293T, JAR et JEG-3 (400 000 cellules) avec la solution de polyéthylèneimine (PEI) 1mg/ml à un ratio de 1µg ADN : 5µl PEI. Les mêmes transfections ont été réalisées sur les cellules BeWo (200 000 cellules) par l'agent de transfection X-Treme GENE selon les instructions du fournisseur. Après 4 à 6 heures de transfection, les cellules BeWo ont été induites ou non avec la FSK 50 µM. A 36 heures post-transfection, les cellules ont été récoltées et lysées dans un tampon de lyse adapté aux dosages de l'activité luciférase (25 mM Tris phosphate, pH 7.8, 2 mM DTT, 1% Triton X-100, 10% glycérol).

3.2.3 Dosage de l'activité luciférase et identification de la région promotrice

Les lysats ont été dosés pour leur activité β-Galactosidase et luciférase. L'activité β-Galactosidase a été dosée avec le kit Tropix® (*Tropix®*, *Applied Biosystems*), selon les instructions du fournisseur alors que l'activité luciférase a été mesurée par l'ajout de tampon contenant la luciférine (20 mM tricine, 1.07 mM (MgCO₃)₄·Mg(OH)₂·5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 0.1 mM EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*), 220 µM coenzyme A, 4.7 µM sel de potassium D-luciferine, 530

μ M ATP, 33.3 mM DTT). L'activité des deux enzymes a été mesurée à l'aide d'un *Microtiter Plate Luminometer* (DYNEX MLX) après une seule injection de 100 μ l de tampon.

3.3 Détection de la protéine MFSD2a au niveau cellulaire et exosomal

Afin de simplifier la détection de la protéine, les plasmides suivants ont été utilisés : pEF6/MFSD2a-V5-His (MFSD2a-V5) exprimant l'isoforme 2 de MFSD2a étiqueté V5 et His gracieusement donné par l'équipe du Dr. Tommaso A Dragani du département de prévention et de médecine de l'IRRCs (Spinola et al., 2010) et pEF6/MFSD2a-STOP (MFSD2a) exprimant l'isoforme 2 de MFSD2a, sans étiquette. Le plasmide pHCMV-Syncytine 2 est le cDNA codant pour la protéine Syncytine-2 (S2), cloné entre les sites XhoI et KpnI dans le plasmide pHCMV. Le plasmide pTT5-GFP (GFP) exprime la *Green Fluorescent Protein* afin de servir de contrôle de transfection.

3.3.1 Transfection des cellules HEK293T, COS-7, BeWo et microporation des cellules CTV

Un (1,0) μ g de la construction d'intérêt (GFP, S2, MFSD2a-V5 ou MFSD2a) a été transfectées dans les cellules HEK293T ou COS-7 (400 000 cellules) avec la solution de polyéthylèneimine (PEI) 1mg/ml à un ratio de 1 μ g ADN : 5 μ l PEI. Les mêmes transfections ont été réalisées sur les cellules BeWo (200 000 cellules) par le X-Treme GENE selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich). Les cellules CTV (3 000 000 cellules), ont été microporées avec 1 pulsation de 30ms à 1300V sur un appareil MP-100 (Digital Bio).

3.3.2 Détection de la protéine dans des lysats cellulaires et exosomes par immunobuvardage

Pour détecter la protéine par immunobuvardage, les cellules ont été trypsinées et lysées dans un tampon de lyse de type RIPA. Les exosomes ont été récupérés par

ultracentrifugations séquentielles des milieux de culture des HEK293T, BeWo, JAR, JEG-3 et CTV après 48h de culture (Figure 3.1). 20 µg de protéines cellulaires totales et 25 µg de protéines d'exosomes ont été déposés sur gel de polyacrylamide 12% puis migrés et transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes ont été bloquées avec une solution de BSA 5% et incubées avec un IgG lapin dirigé contre MFSD2a (dilution 1/700) de la compagnie SantaCruz (clone H-130) ou un IgG souris dirigée contre l'étiquette V5 (dilution 1/3000) de la compagnie Thermofisher (Clone R960-25). Après trois lavages au PBST 0,05%, les membranes ont été incubées avec un anticorps anti-IgG lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) (dilution 1/5000). Les signaux ont alors été détectés avec le Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore). Les membranes ont été révélées avec le système Fusion FX5.

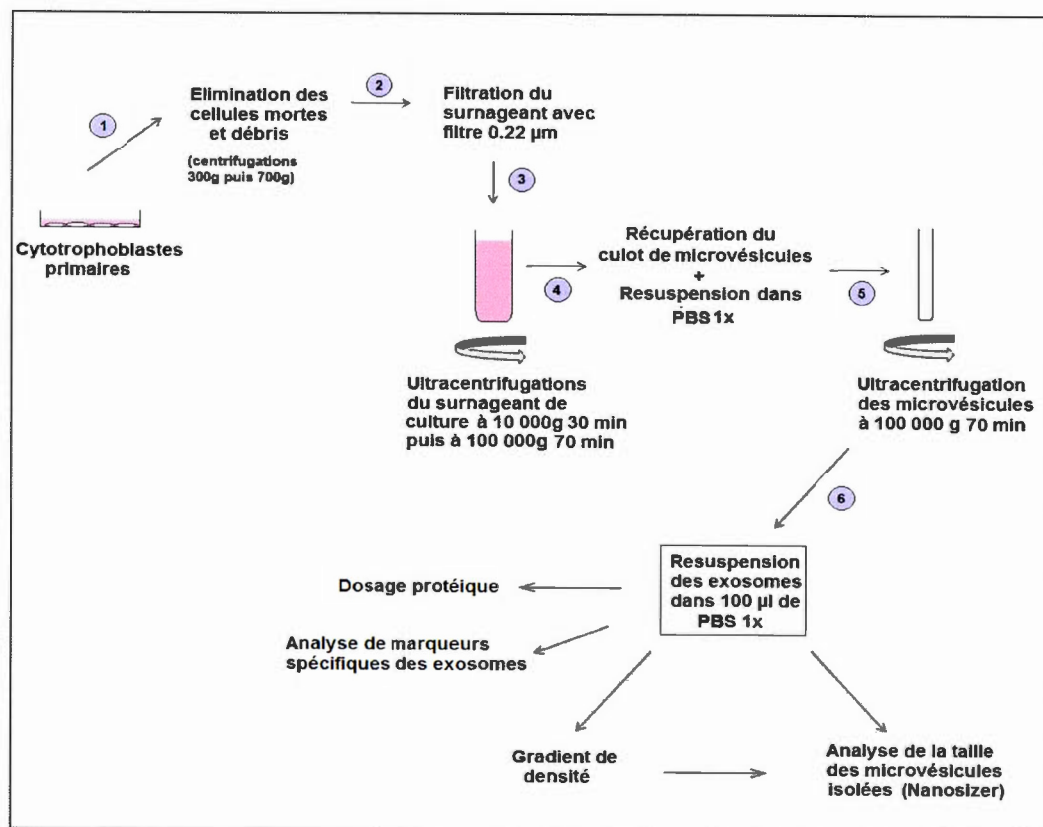


Figure 3.1 Isolement des exosomes par ultracentrifugation différentielle.

3.3.3 Vérification de la présence de MFSD2a membranaire sur les cellules et exosomes de cellules HEK293T, transfectées avec MFSD2-V5, par cytométrie en flux et immunofluorescence

3.3.3.1 Cytométrie en flux

Afin d'être visibles en cytométrie en flux, les exosomes doivent être fixés à des billes de phényl-sépharose de 4 µm (GE Healthcare Life Sciences). Les billes sont constituées en agarose 6% et couverte d'un ligand hydrophobe, le phényl-sépharose. Lorsque les exosomes sont mis en contact avec les billes, ils vont naturellement se lier à la surface des billes, par les groupements phénols. Dix (10) µg d'exosomes ont été mis en contact avec 10 µl de billes préalablement lavées au PBS toute la nuit. Il s'en suit l'ajout de glycine à une concentration finale de 0,1M. Après

trois lavages au PBS, les billes ont été bloquées avec une solution de PBS 5% de BSA et 2% de Sérum humain. Les billes (avec les exosomes à leur surface) ont par la suite été incubées avec un anticorps IgG souris dirigé contre V5 (dilution 1/500). Après plusieurs lavages au PBS, elles ont été incubées avec un anticorps IgG lapin anti-souris couplé Alexa-488 (dilution 1/1000) (Figure 3.2). L'anticorps anti-CD63 a été utilisé comme contrôle suivant le même principe. Un anticorps IgG souris dirigé contre une autre protéine (Myc) a été utilisé comme contrôle négatif pour le marquage. Les protéines ont été détectées par passage des billes dans un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences).

3.3.3.2 Microscopie confocale

Pour l'immunofluorescence en microscopie confocale, les cellules exprimant GFP, MFSD2a, MFSD2a-V5 et/ou Syncytine-2 ont été premièrement fixées au paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes, perméabilisées ou non au Triton® X-100 0,1% (Sigma) pendant 10 minutes et bloquées avec une solution de lait 5% et sérum de veaux fœtal 2% pendant 2 heures. L'immunomarquage a ensuite été réalisé par l'ajout des anticorps primaires de lapin anti-MFSD2a (1/500), souris anti-V5 (1/500) ou lapin anti-Syncytine-2 (1/500) et les anticorps secondaires anti-IgG souris-488 (1/1000), anti-IgG lapin-488 (1/1000), anti-IgG souris-568 (1/1000) ou anti-IgG lapin-568 (1/1000). Les lavages ont été faits avec du PBS-Triton 0,05%. Les cellules marquées ont été observées en microscopie confocale avec un microscope Nikon A1.

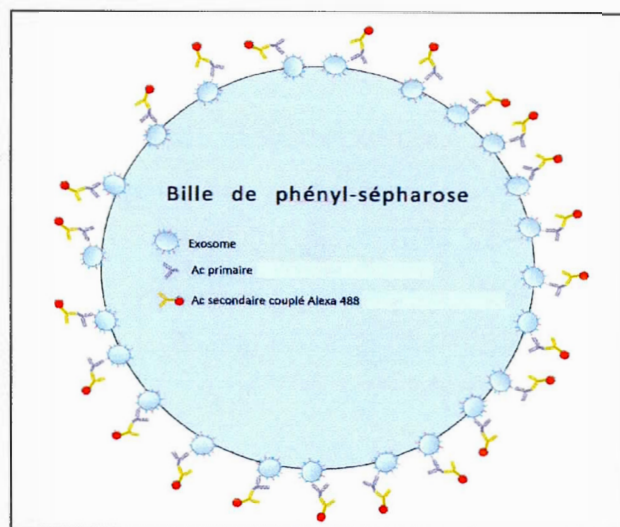


Figure 3.2 Schéma de bille de phényl-sépharose avec des exosomes fixés à leur surface et marqués avec des anticorps.

3.4 Tests statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées sous la forme de triplicata. Les résultats sont exprimés selon la moyenne \pm l'écart-type de la moyenne. Les analyses statistiques (Anova) ont été effectuées avec le programme Excel.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

Les résultats présentés ici sont des illustrations représentatives des triplicatas.

4.1 Caractérisation des ARNm de MFSD2a dans les lignées cellulaires BeWo, JAR et JEG-3.

4.1.1 Analyses RT-PCR pour MFSD2a sur les ARN totaux de cellules HEK293T, BeWo, CTV, JAR et JEG-3.

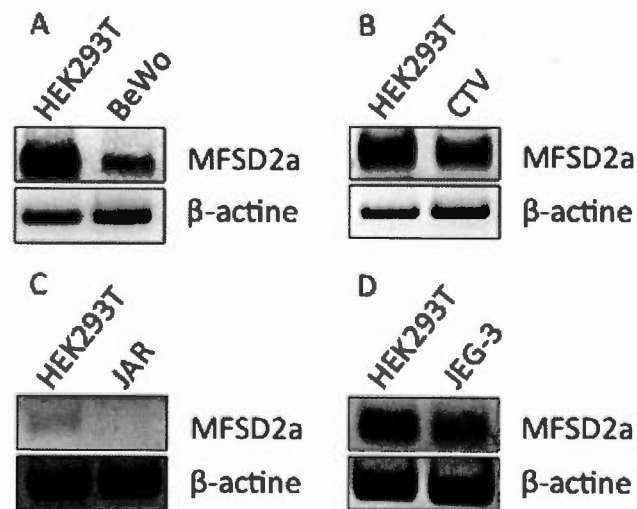


Figure 4.1 Analyse de l'expression de MFSD2a dans les lignées cellulaires de choriocarcinomes. Les ARN totaux ont été extraits de culture cellulaire à confluence grâce au Trizol[®] puis rétrotranscrits avant d'être migrés sur un gel d'argarose 1% à 100V pendant 45 minutes. Les ARN totaux de cellules HEK293T

ont été utilisés comme contrôle positif et la β -Actine comme contrôle de rétrotranscription.

Il était intéressant de vérifier la présence d'ARNm codant pour MFSD2a dans différentes lignées cellulaires afin de vérifier son expression. Pour ce faire, la présence des ARNm codant pour MFSD2a dans les lignées cellulaires placentaires BeWo, JAR, JEG-3 et cytotrophoblastes villos (CTV) a été analysée par RT-PCR. Les cellules HEK293T et la β -Actine sont les contrôles positifs de PCR et d'extraction d'ARN. On constate que l'ARNm codant pour MFSD2a est présent dans les cellules BeWo, CTV et JEG-3. Il semble cependant que ce transcrit soit absent dans les cellules JAR.

4.1.2 Analyse 5' RACE des ARN totaux de HEK293T afin d'identifier le site d'initiation de transcription

L'utilisation du 5'RACE avait pour objectif de permettre de vérifier le TSS de l'ARNm codant pour MFSD2a.

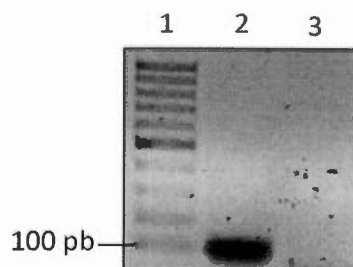


Figure 4.2 Produit de PCR de la dernière PCR nichée de la réaction de 5'RACE des ARN totaux de cellules HEK293T. Le dernier produit de PCR nichée de la réaction de 5'RACE a été migré sur un gel d'agarose 1% à 100V pendant 45 minutes. Les puits sont les suivants : 1) Échelle de poids moléculaire allant jusqu'à 100 paires de base. 2) Produit de PCR de la dernière PCR de 5'RACE. 3) Contrôle négatif de PCR.

La technique de 5'RACE consiste en une série de deux PCR nichées. La dernière réaction de PCR du 5'RACE, réalisé sur les ARN totaux de cellules HEK293T, permet d'amplifier une seule bande d'environ 130 nucléotides, ce qui correspond au fragment attendu. En effet, les amorces utilisées devaient donner lieu à l'amplification d'une région de 130 nt. C'est ce produit de PCR, visible dans le deuxième puits de cette figure, qui a été ligué dans pJET1.2/*Blunt*.

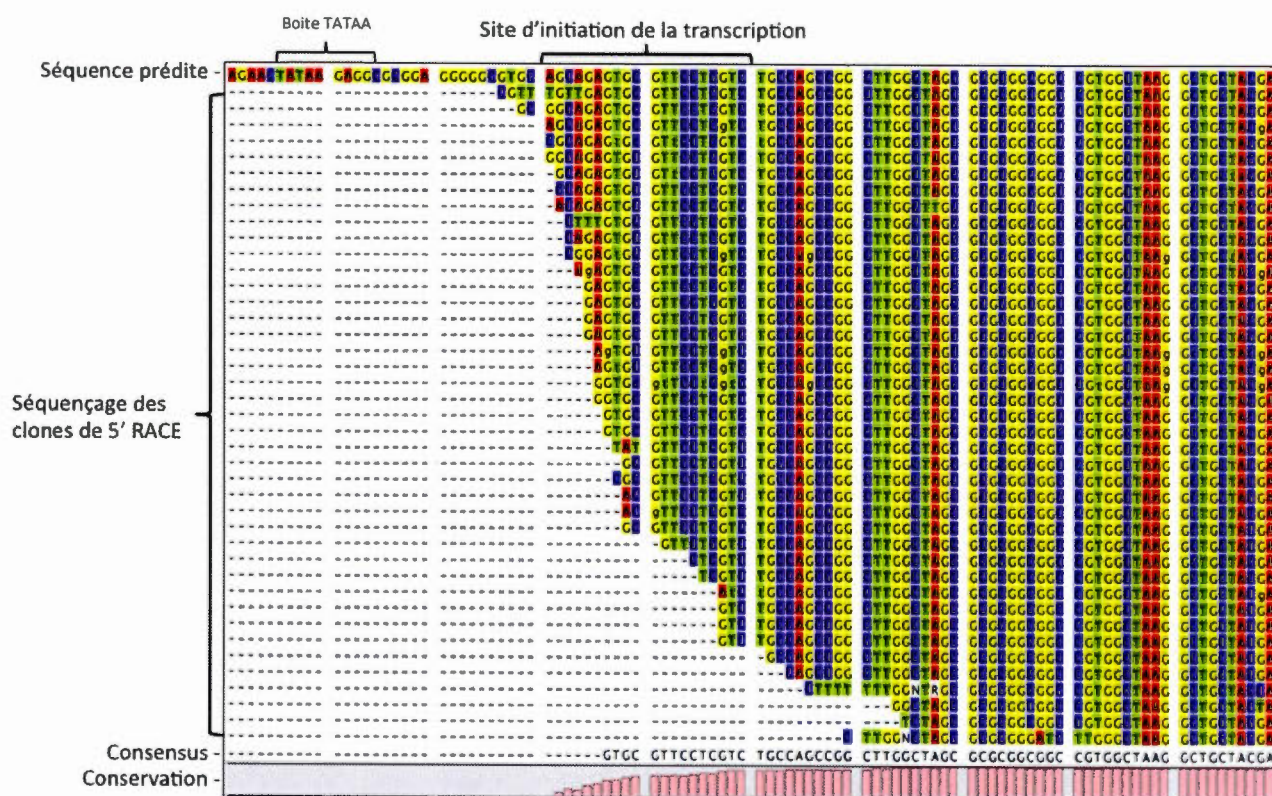


Figure 4.3 5'RACE effectué sur les ARN totaux de cellules HEK293T. Les clones, contenant l'amplicon du 5'RACE, ont été séquencés et alignés selon leur correspondance par rapport à la séquence prédite de pour l'exon 1 de MFSD2a.

Les résultats permettent de mettre en évidence que le TSS est localisé 30 à 40 nucléotides en aval de la séquence prédite par le *Consensus Coding Gene Sequences*

Project (CCDS) (Pruitt et al., 2009) et qu'il y a une région similaire à une boîte TATAA à environ 25 nucléotides en amont de ce nouveau TSS.

Les résultats de cette première partie suggèrent que le transcrit codant pour MFSD2a est bien présent dans les cellules trophoblastiques et les cellules HEK293T et que la position du TSS est le résultat du positionnement de la boîte TATA.

4.2 Localisation et caractérisation de la région promotrice du gène MFSD2a

4.2.1 Clonage de la région en amont du gène MFSD2a dans le plasmide PGL3-Basic

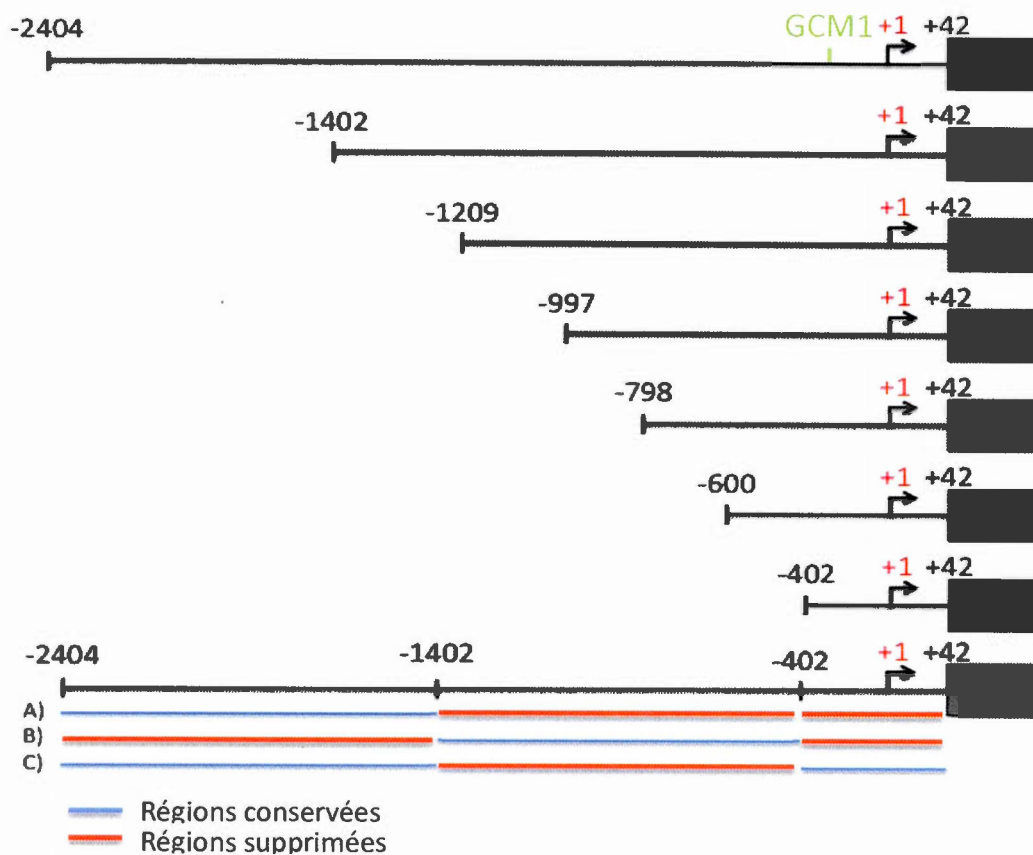


Figure 4.4 Schéma des différentes régions du promoteur du gène MFSD2a cloné dans le plasmide pGL3-Basic.

Afin de pouvoir déterminer l'activité promotrice de la région en amont du gène MFSD2a, il a été nécessaire de fabriquer des plasmides contenant des fragments plus ou moins longs de la région promotrice de MFSD2a devant le gène rapporteur luciférase. Les mutants A (-2404 à -1402), B (-1402 à -402) et C (-2404 à -1402 et -402 à +42) ont été construits afin de déterminer s'il existe une activité promotrice dans les régions -2404 à -402 et vérifier si la région -2404 à -1402 possède des éléments de régulations pouvant stimuler directement la région promotrice -402 à +42. Ces plasmides ont été créés par amplification de la région promotrice cible par PCR puis ligation de ces fragments dans le plasmide pGL3-Basic, en amont du gène rapporteur luciférase avant d'être finalement séquencés pour vérifier l'exactitude des séquences clonées. Ils ont été utilisés lors des transfection nécessaires à l'étude de l'activité promotrice de MFSD2a (voir les résultats dans la section 4.2.2).

4.2.2 Analyse de l'activité promotrice de MFSD2a par l'utilisation de mutants de délétions.

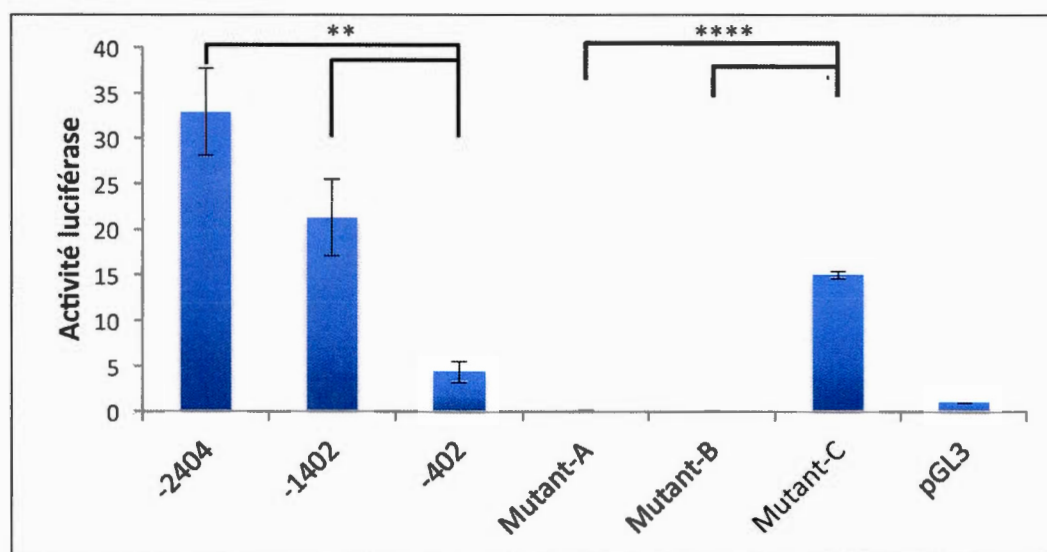


Figure 4.5 Niveaux d'expression relative de la luciférase des différents clones dans les cellules HEK293T. Les cellules HEK293T (200 000 cellules) ont été transfectées avec 1 µg de plasmide d'intérêt et 0,2 µg de pRc-Actin-LacZ avec un

ratio de PEI 1:5. Après 36 heures, les cellules ont été lysées et les essais luciférase ont été réalisés. Les résultats présentés sont normalisés par rapport à l'activité β -Gal et pGL3 (fixé à une valeur de 1).

Les clones -2404, -1402, -402, Mutant-A, Mutant-B et Mutant-C ont été utilisés afin de déterminer l'activité promotrice de ces différentes régions. Pour ce faire, ces clones ont été transfectés dans des cellules HEK293T, et après 36h les cellules ont été lysées. Un dosage de l'activité luciférase et β -Gal a alors été réalisé. L'étude de l'expression du gène luciférase, sous le contrôle de différents fragments de la région promotrice de MFSD2a, dans les cellules HEK293T permet de mettre en évidence que plus le fragment cloné est grand, plus l'expression est importante. Les mutants A et B ne montrent aucune expression alors que le mutant C a une activité plus forte que le clone -402, mais plus faible que -1402.

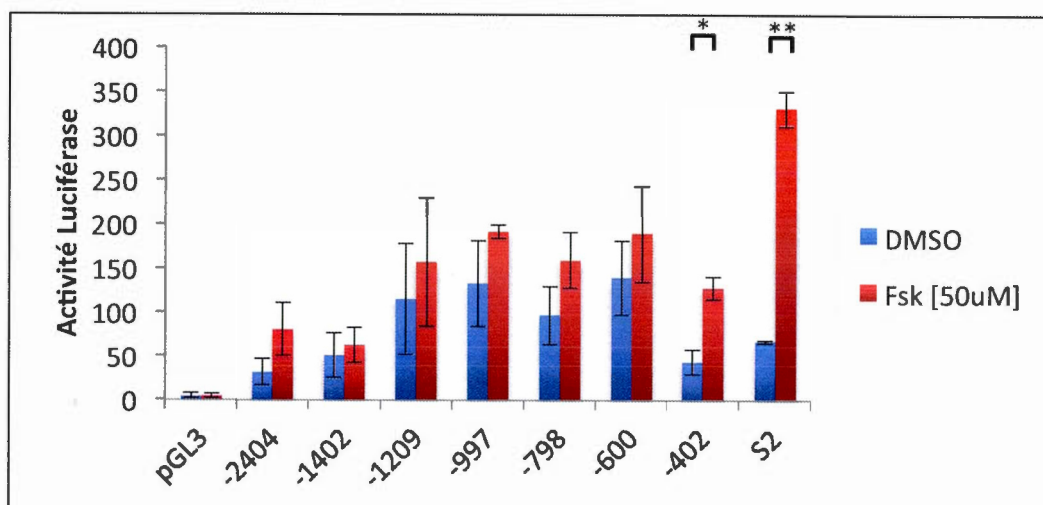


Figure 4.6 **Activité promotrice des différents mutants de délétion du promoteur dans les cellules BeWo.** Les cellules BeWo (120 000) ont été transfectées avec 1 μ g de plasmide d'intérêt et 0,2 μ g de pRc-Actin-LacZ avec le X-Treme GENE selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich). L'induction à la forskoline (50 μ M), ou le contrôle DMSO, a été effectuée 4 heures après transfections. À 36 heures post-transfection, les cellules ont été lysées et les essais luciférase ont été réalisés. Les résultats présentés sont normalisés par rapport à l'activité β -Gal et pGL3 (fixé à une valeur de 1). Les clones -2404 à -402 sont des fragments de

différentes tailles du promoteur MFSD2a. S2 est un fragment de -450 à +51 de la région promotrice du gène Syncytine-2.

Les clones -2404, -1402, -1209, -997, -798, -600, -402 et S2 ont été utilisés afin de déterminer l'activité promotrice de ces différentes régions dans les cellules BeWo. Pour ce faire, ces clones ont été transfectés dans des cellules BeWo, ont été induites 4 h après transfection puis lysées à 36 h post transfection. Un dosage de l'activité luciférase et β -Gal a alors été réalisé. L'expression du gène luciférase, sous le contrôle de différents fragments de la région promotrice de MFSD2a, ou Syncytine-2, dans les cellules BeWo, induite ou non, met à en évidence que l'expression est assez irrégulière. Les fragments -2404 et -1402 ont des activités assez faibles, environ 40 RLU en présence de DMSO mais environ 70 RLU en présence de forskoline. Les fragments -1209 à -600 ont des activités plus fortes avec environ 110 RLU en présence de DMSO mais environ 170 RLU en présence de forskoline. Le dernier fragment -402 à une activité faible en présence de DMSO (43 RLU) mais beaucoup plus forte en présence de forskoline (128 RLU). Tel que rapporté auparavant, le promoteur du gène de la Syncytine-2, utilisé comme contrôle positif, subit aussi une augmentation en présence de Forskoline avec 330 RLU contre 67 RLU en présence de DMSO (Toufaily et al., 2015).

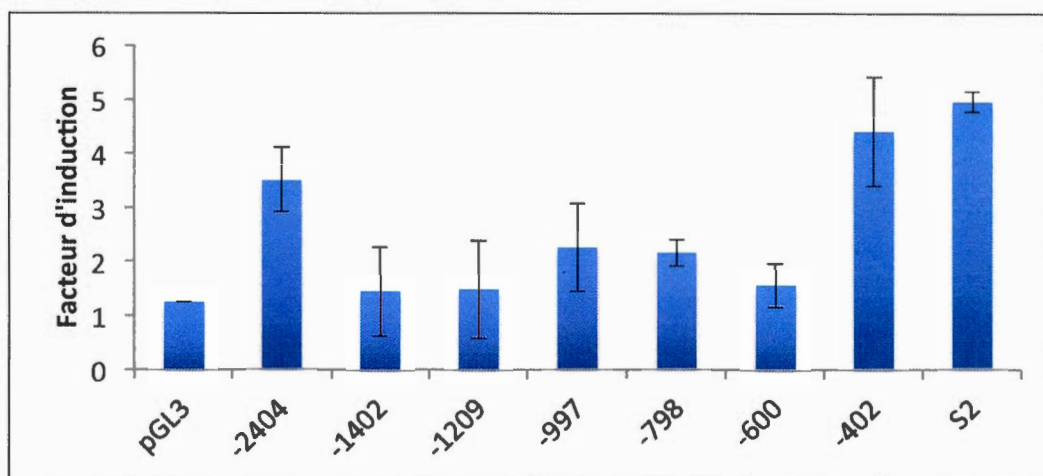


Figure 4.7 Induction de l'activité promotrice des mutants de délétion de MFSD2a dans les cellules BeWo suite à l'activation par la forskoline. Les cellules BeWo (120 000) ont été transfectées avec 1 μ g de plasmide d'intérêt et 0,2 μ g de pRc-Actin-LacZ avec le X-Treme GENE selon les instructions du fournisseur (Sigma-Aldrich). L'induction à la forskoline (50 μ M), ou le contrôle DMSO, a été fait 4 heures après transfection. À 36 heures post-transfection, les cellules ont été lysées et les essais luciférase ont été réalisés. Les résultats sont présentés sous la forme d'induction et normalisés par rapport à l'activité β -Gal et pGL3.

Après avoir déterminé l'activité relative pour les différents fragments de la région promotrice de MFSD2a, il était intéressant d'aborder les résultats différemment en déterminant le facteur d'induction, pour chaque clone, la division de la valeur (RLU) induite à la forskoline par la valeur DMSO. Ceci permet d'observer que le facteur d'induction pour les cellules BeWo induites ou non à la forskoline est d'environ 3,5x pour le fragment -2404, 1,5x pour les -1402 à -600 et 4,5x pour le fragment -402 du promoteur MFSD2a. Le facteur d'induction est de 5x pour le promoteur Syncytine-2 utilisé comme contrôle positif d'induction.

Les résultats de cette seconde partie suggèrent qu'il existe des éléments de régulation synergique dans la région promotrice de MFSD2a et que seule la région -402 à +42 est sensible à la forskoline.

4.3 Détection de la protéine MFSD2a dans les cellules et exosomes des cellules HEK293T, BeWo et CTV.

Afin d'étudier la protéine MFSD2a il était important de vérifier qu'il était possible de la détecter dans les cellules et exosomes. Pour ce faire, l'utilisation de techniques telles que l'immunobuvardage ou la microscopie confocale nous a permis de la détecter. Cette dernière permet en plus de déterminer la localisation cellulaire de la protéine MFSD2a.

4.3.1 **Détection de la protéine MFSD2a dans le cerveau et le cytotrophoblastes villex par immunobuvardage**

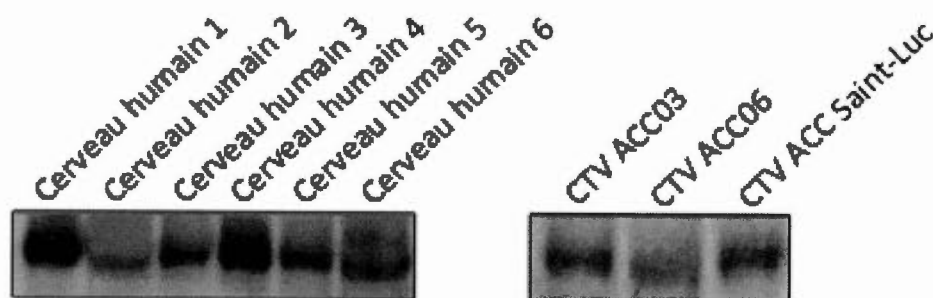


Figure 4.8 Immunobuvardage anti-MFSD2a sur lysats de cerveaux ou CTV humains. Les échantillons de cerveaux humains (1 à 6) et de placentas (CTV ACC03, CTV ACC06 et CTV ACC Saint-Luc) ont été lysés dans du tampon de lyse RIPA. L'immunobuvardage présenté ici a été réalisé sur 10µg de protéines totales avec un anticorps anti-MFSD2a de la compagnie SantaCruz dilué 1/700.

Dans le but de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-MFSD2a un immunobuvardage a été réalisé sur des extraits de cerveau et de cytotrophoblastes villex humains. L'utilisation de l'anticorps anti-MFSD2a sur ces lysats de cellules exprimant naturellement MFSD2a a effectivement permis de vérifier la spécificité de cet anticorps avec la présence d'une bande à 55kDa, correspondant au poids attendu de MFSD2a.

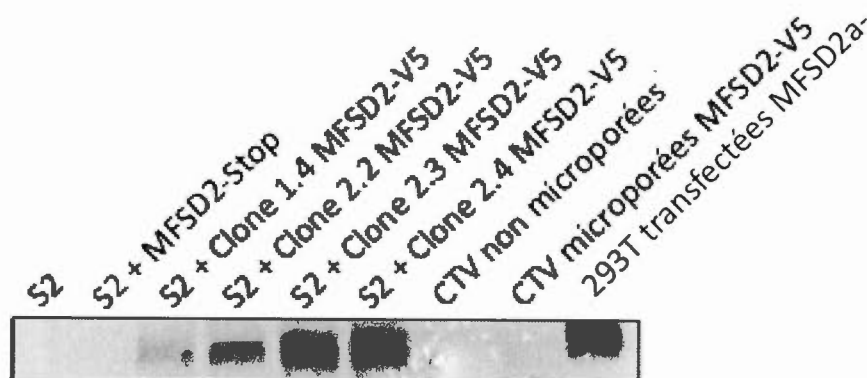


Figure 4.9 Immunobuvardage anti-V5 sur lysats de cellules fusionnant, exprimant MFSD2a ou MFSD2a-V5 et Syncytin-2. Les cellules HEK293T (200 000 cellules) ont été transfectées avec 0,5µg de plasmide d'intérêt et 0,5µg de phCMV-Syncytine-2, exprimant la protéine Syncytine-2, avec un ratio de PEI 1:5. Les CTV ont été microporées avec 1 pulsation de 30ms à 1300V avec l'appareil MP-100 (Digital Bio). Les échantillons ont été lysés dans du tampon de lyse RIPA. L'immunobuvardage a été réalisé sur 10µg de protéines totales avec un anticorps anti-V5 de la compagnie ThermoFisher diluée au 1/3000.

Dans le but de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-V5, un immunobuvardage a été réalisé sur des lysats de cellules HEK293T transfectées ou CTV microporées par des plasmides exprimant Syncytine-2 (S2), MFSD2a (ici nommé MFSD2a-Stop car il n'y a pas d'étiquettes) et/ou différents clones de MFSD2a étiquetés V5 (MFSD2a-V5). Les différents clones induisent tous la fusion en présence de Syncytine-2 et sont issus de différentes colonies du même clonage moléculaire. L'utilisation de l'anticorps anti-V5 sur ces lysats a permis de vérifier la spécificité de cet anticorps, car il est possible de détecter une bande à la bonne taille (55kDa) dans les lysats de cellules exprimant la protéine MFSD2a étiquetée V5.

4.3.2 Vérification de la présence de MFSD2a membranaire sur les cellules par immunofluorescence.

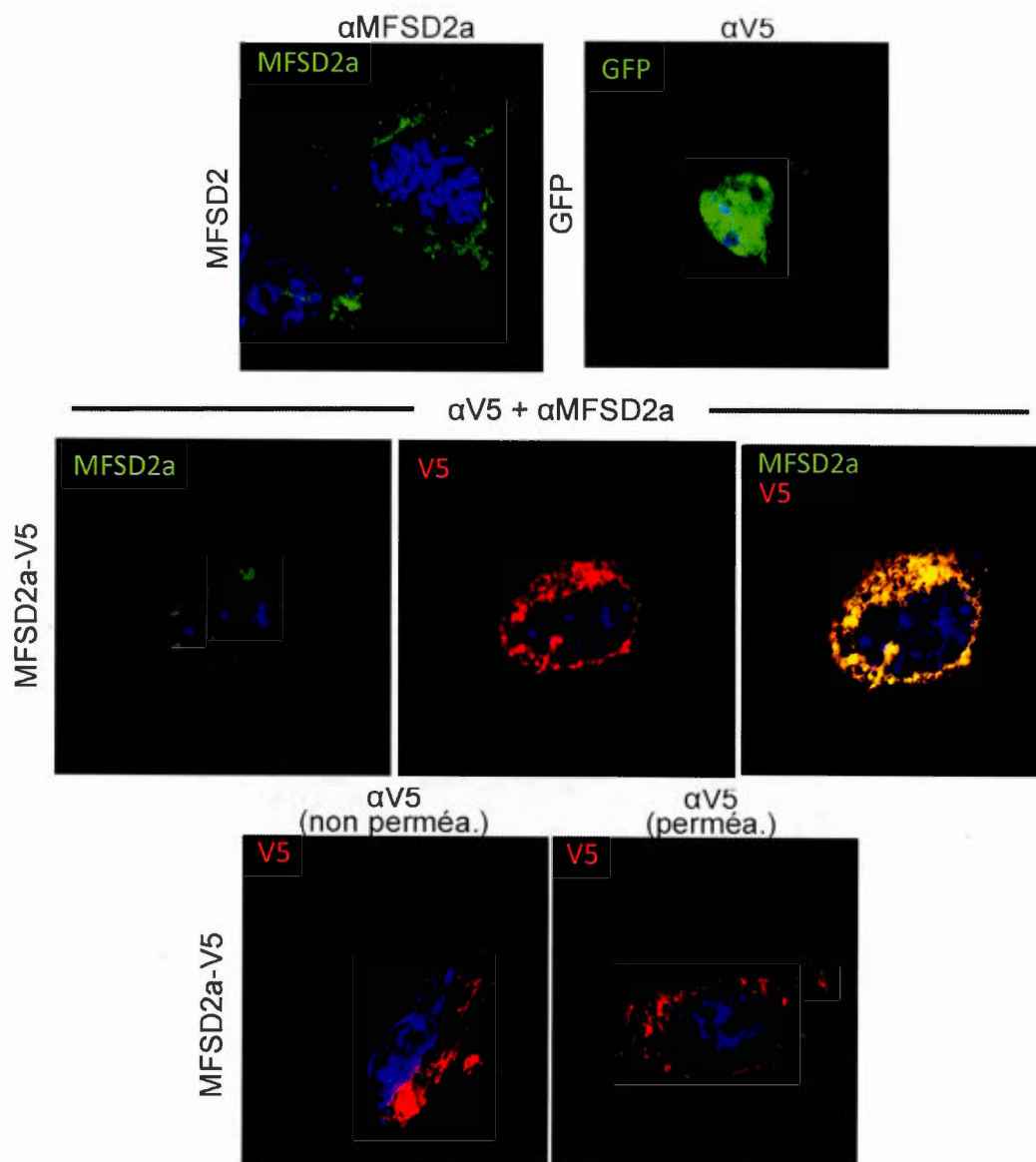


Figure 4.10 Vérification de la détection et colocalisation du tag V5 et MFSD2a dans les cellules COS-7. Les cellules COS-7 (100 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96 h puis transfectées avec 0,5 μ g des plasmides GFP, MFSD2a et/ou MFSD2a-V5 au PEI (ratio 1 : 5). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-MFSD2a de lapin (1/500) et/ou anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG lapin conjugué Alexa 488 (1/1000) et/ou anti-

IgG souris conjugué Alexa 568 (1/1000). Les observations en microscopie confocale ont été réalisées à l'objectif 40x.

Afin de vérifier que les anticorps anti-MFSD2a et anti-V5 étaient fonctionnels en microscopie confocale et permettaient ainsi la localisation de la protéine, des cellules de singe COS-7, ont été transfectées avec des plasmides exprimant MFSD2a et MFSD2a-V5. L'imagerie confocale a alors permis de mettre en évidence que les anticorps dirigés contre MFSD2a et V5 sont bien spécifiques et qu'il y a colocalisation pour les deux anticorps dans des cellules COS-7 transfectées avec le plasmide MFSD2a-V5. Il semblerait aussi que l'anticorps anti-V5 permet aussi de détecter des signaux similaires de la protéine MFSD2a dans des cellules non perméabilisées (Triton 0,1% pendant 10 minutes).

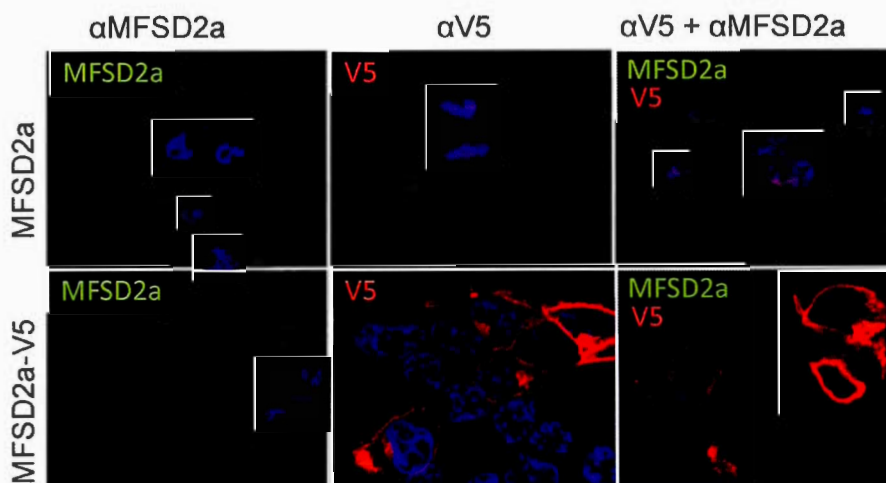


Figure 4.11 Vérification de l'expression de MFSD2a et MFSD2a-V5 dans les cellules HEK293T. Les cellules HEK293T (100 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96 h puis transfectées avec 0,5 µg des plasmides MFSD2a ou MFSD2a-V5 au PEI (ratio 1 : 5). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-MFSD2a de lapin (1/500) et/ou anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG lapin conjugué Alexa 488 (1/1000) et/ou anti-IgG souris

conjugué Alexa 568 (1/1000). Les observations en microscopie confocale ont été réalisées à l'objectif 40x.

Comme pour les cellules COS-7, les cellules humaines HEK293T, ont été utilisées pour vérifier la spécificité des anticorps dans des cellules humaines. L'imagerie confocale a permis de montrer que l'anticorps anti-MFSD2a ne fonctionne pas pour détecter la protéine dans les cellules HEK293T. L'anticorps anti-V5 fonctionne cependant très bien.

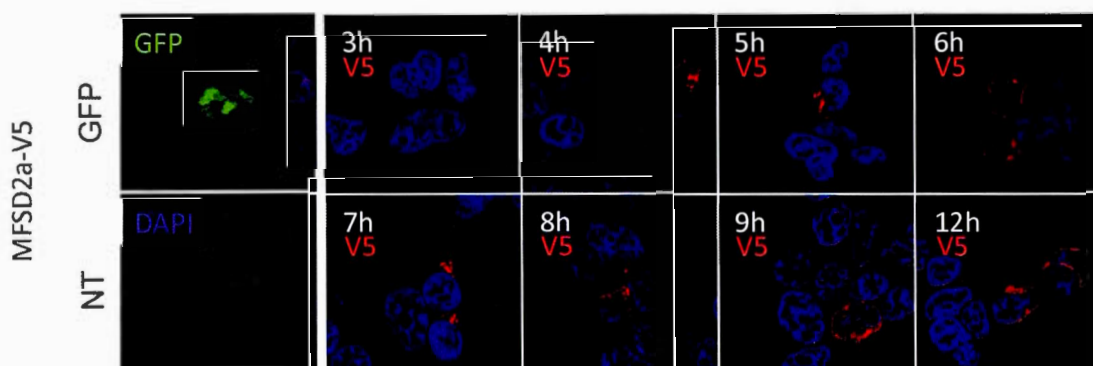


Figure 4.12 Analyse de l'expression de MFSD2a-V5 au cours du temps par immunofluorescence dans des cellules HEK293T. Les cellules HEK293T (100 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96h puis transfectées avec 0,5 µg des plasmides GFP ou MFSD2a-V5 au PEI (ratio 1 : 5). Elles ont ensuite été fixées à différents temps (3 h à 12 h) avec une solution de PFA 4% puis incubées avec un anticorps primaire anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG souris conjuguée Alexa 568 (1/1000). Les observations en microscopie confocale ont été réalisées à l'objectif 40x aux temps indiqués dans les cases.

Dans le but de déterminer la vitesse d'expression de la protéine MFSD2a-V5 dans les cellules, une cinétique d'expression a été réalisée. Pour ce faire, des cellules HEK293T ont été fixées au PFA entre 3 et 12 h après transfection. L'imagerie confocale a alors permis de mettre en évidence que la protéine exprimée par le plasmide MFSD2a-V5 se retrouve à la membrane des cellules HEK293T 4 heures après transfection.

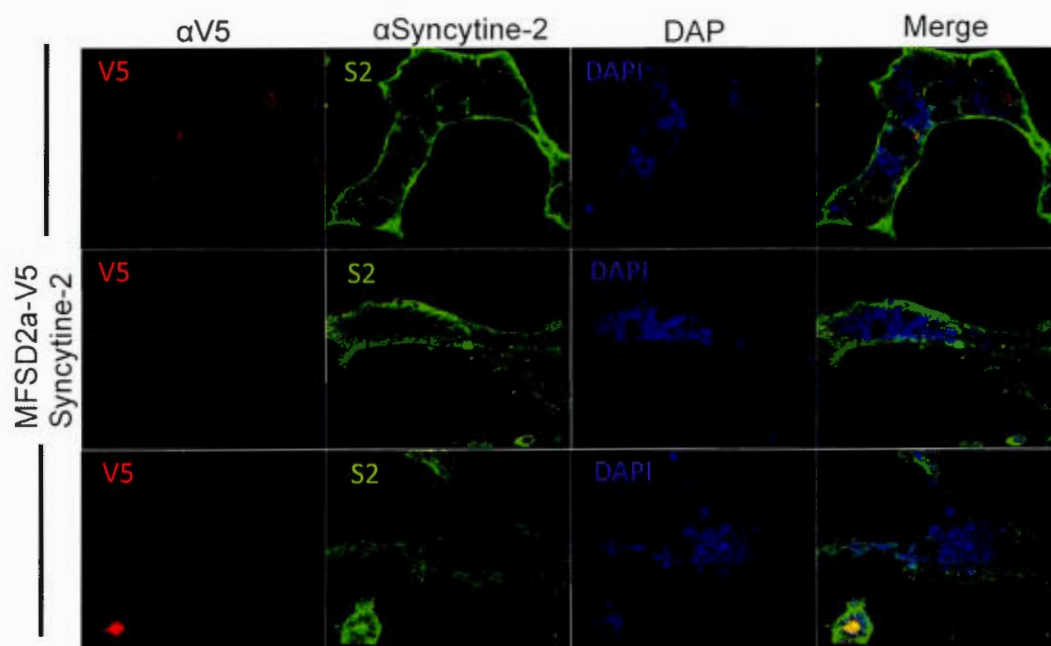


Figure 4.13 Co-expression de MFSD2a-V5 et Syncytine-2 dans des cellules HEK293T. Les cellules HEK293T (100 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96h puis transfectées avec 0,5 µg des plasmides MFSD2a-V5 et S2 au PEI (ratio 1 : 5). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-Syncytine-2 de lapin (1/500) et anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG lapin conjugué Alexa 488 (1/1000) et anti-IgG souris conjuguée Alexa 568 (1/1000). Les observations en microscopie confocale ont été réalisées à l'objectif 40x.

Afin d'observer le comportement des protéines lors de la co-expression de MFSD2a-V5 et Syncytine-2, les cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les deux plasmides les exprimant. Il est possible de constater, par imagerie confocale, que les cellules fusionnent et que MFSD2a-V5 semble être internalisé au cœur des syncytia, alors que Syncytine-2 semble rester partout à la membrane.

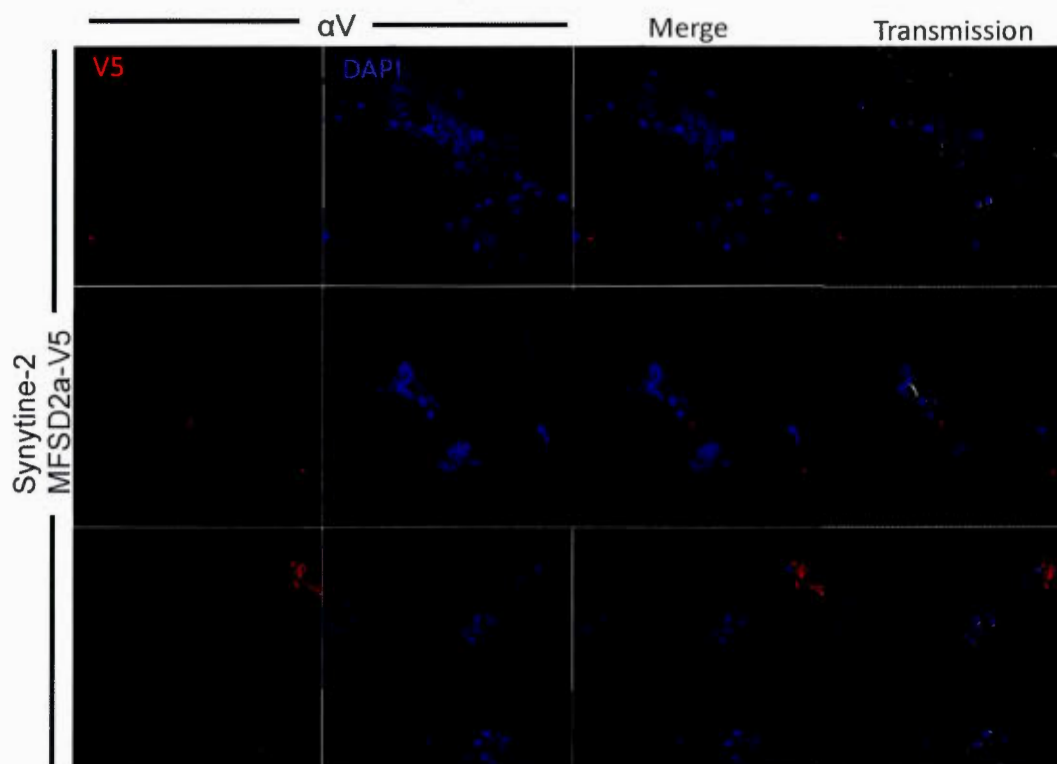


Figure 4.14 Détection de MFSD2a-V5 dans les cellules HEK293T transfectées avec MFSD2a-V5 et Syncytine-2. Les cellules HEK293T (100 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96 h puis transfectées avec 0,5 µg des plasmides MFSD2a-V5 et S2 au PEI (ratio 1 : 5). Elles ont ensuite été incubées avec un anticorps primaire anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG souris conjugué Alexa 568 (1/1000). Les observations en microscopie confocale ont été faite à l'objectif 40x.

Comme précédemment, la co-expression de MFSD2a-V5 et Syncytine-2 induit la fusion des cellules HEK293T. L'imagerie confocale permet de mettre en évidence une accumulation de la protéine MFSD2a-V5 au cœur des syncytia.

4.3.3 Vérification de la présence de MFSD2a dans les exosomes par cytométrie en flux.

La microscopie confocale ne permettant pas une résolution assez fine, pour la détection des exosomes, il était nécessaire d'utiliser une autre technique. L'utilisation de la cytométrie en flux, en fixant les exosomes à des billes, permettait de régler ce problème.

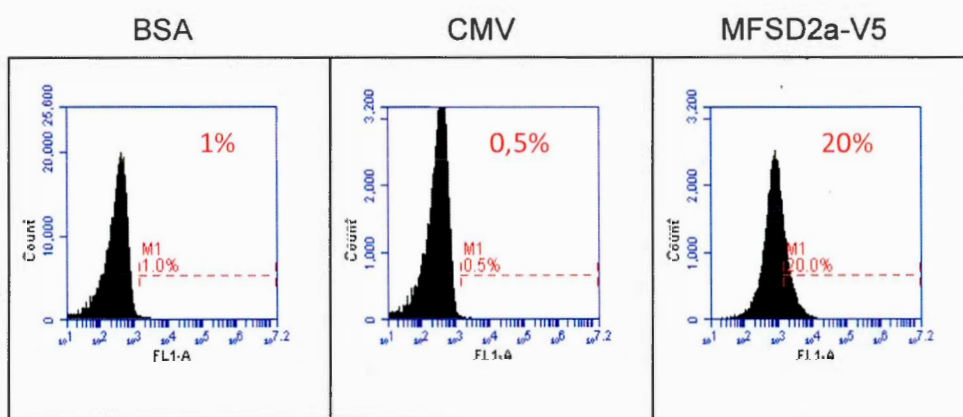


Figure 4.15 Détection de la protéine MFSD2a à la surface des exosomes provenant de HEK293T transfectées avec MFSD2a-V5. Les cellules HEK293T (200 000 cellules) ont été cultivées pendant 24 à 96 h puis transfectées avec 1 µg des plasmides phCMV (vecteur vide contrôle) et MFSD2a-V5 au PEI (ratio 1 : 5). Après 48h, les milieux de culture ont été récupérés afin d'extraire les exosomes par ultracentrifugation différentielle. Ils ont alors été fixés sur des billes de phénylsépharose de 4µm. Une fois fixés sur les billes, les exosomes ont été incubés avec un anticorps primaire anti-V5 de souris (1/500) puis un anticorps secondaire anti-IgG souris conjuguée Alexa 488 (1/1000).

MFSD2a étant une protéine membranaire et associée à Syncytine-2, pouvant aider à la fusion des exosomes avec les cellules, il était intéressant de vérifier la présence de la protéine MFSD2a-V5 dans les exosomes. La cytométrie a permis de mettre en évidence qu'il est possible de détecter l'expression de la protéine MFSD2a-V5 sur ces exosomes.

Les résultats de cette troisième partie suggèrent que MFSD2a-V5 est correctement exprimée à la membrane des cellules et des exosomes, et que son domaine d'interaction avec Syncytine-2, elle aussi membranaire, est toujours fonctionnel même en présence d'une étiquette V5-His. Aussi, il est très intéressant de noter la localisation de MFSD2a dans les cellules avant et après fusion.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Lors de cette étude, les objectifs étaient de caractériser l'ARNm codant pour MFSD2a, étudier l'activité de son promoteur et localiser la protéine, afin d'améliorer nos connaissances fondamentales sur la protéine MFSD2a, tant au niveau transcriptionnel que protéique.

5.1 Caractérisation de l'ARNm

Lors de cette étude, il fallait initialement déterminer la présence d'ARNm codant pour la protéine MFSD2a dans différents types cellulaires placentaires. La lignée cellulaire HEK293T a été utilisée comme contrôle positif, car il avait déjà été démontré que la protéine et les ARNm y sont présents de manière naturelle (Uhlen et al., 2015). Cette démarche a permis de confirmer la présence de MFSD2a dans les cellules BeWo, les cytotrophoblastes villosus et les JEG-3. Les cellules JAR ne semblent pas avoir d'ARNm codant pour MFSD2a (Figure 4.1). Cette conclusion n'est pas définitive, car les résultats obtenus à ce jour ne sont pas suffisamment clairs pour affirmer ce résultat définitivement. Afin de répondre clairement à cette question, et déterminer clairement les niveaux d'expression de MFSD2a dans les différentes lignées cellulaires, il aurait été intéressant de réaliser une PCR quantitative, ou d'utiliser d'autres amorces. Ceci aurait permis, en plus de vérifier la présence, de quantifier ses niveaux d'expression dans les différentes cellules.

L'utilisation de la technique de 5' RACE, a ensuite permis de vérifier la position du site d'initiation de transcription (TSS) de MFSD2a dans les cellules HEK293T. En plus des différents contrôles de réaction effectués aux différentes étapes de PCR, l'amplification d'une seule bande spécifique, d'environ 130 nucléotides, dans notre dernière réaction de PCR nichée (Figure 4.2) et la possibilité d'extraire un insert de la même taille dans les clones pJET qui ont été séquencés confirment que la technique a fonctionné correctement. Les résultats du séquençage montrent que la prédiction du TSS, proposé par le projet *Consensus Coding Sequence (CCDS)* (Pruitt et al., 2009), était légèrement mal situé et qu'il est en réalité positionné environ 30 à 40 nucléotides en aval (Figure 4.3) (Lander et al., 2001). De plus, on constate l'absence de promoteur minimal ou de région pouvant habituellement initier la transcription, comme une région d'initiation *Inr* ou *DPE* (*Downstream Promoter Element*) au niveau du TSS, en amont de la séquence prédite, ce qui pouvait laisser présager cette erreur. La correction du TSS a permis de mettre en évidence la présence d'une région très similaire à une boîte TATA à environ 25 nucléotides en amont du nouveau TSS. Pour compléter l'analyse du TSS, il aurait été intéressant d'utiliser la technique de 5' RACE sur les différentes lignées cellulaires placentaires afin de confirmer que l'expression n'est pas dépendante du tissu ou de la lignée cellulaire. Aussi, le séquençage aléatoire du transcriptome entier (ou RNA-Seq), couplé au 5' RACE, aurait permis de mettre en évidence la possible disparité de TSS et d'épissage, comme il existe différents isoformes, selon les types de cellules. Il serait également intéressant de comparer ces résultats à l'expression de MFSD2a dans des placentas de femmes prééclampsiques, afin de vérifier si l'ARNm codant pour MFSD2a est identique à celui retrouvé ou s'il y a des différences pouvant diminuer son efficacité et sa traduction.

L'étude de l'ARNm n'est pas encore totalement complète, mais comme dit précédemment, il serait intéressant de quantifier l'expression de MFSD2a dans différents types cellulaires du placenta. Le repositionnement du TSS est important

pour la détermination de la région promotrice et régulatrice du gène. La recherche et l'étude de l'ARNm permettent donc d'affirmer qu'il se retrouve dans plusieurs lignées cellulaires placentaires et que la position du site d'initiation de la transcription, initialement prédite par analyse informatique, était mal déterminée.

5.2 Caractérisation de la région promotrice

Suite à l'analyse de l'ARNm, il était intéressant de caractériser la région promotrice médiant l'activation suite à une stimulation par la forskoline. Dans un premier temps, il a été nécessaire de fabriquer des plasmides contenant différents fragments de la région en amont du gène afin de vérifier leur activité promotrice. Pour ce faire, différents fragments ou combinaisons de -2404 à +42 ont été clonés devant le gène rapporteur luciférase (Figure 4.4).

Dans un second temps, la transfection de ces plasmides dans les cellules HEK293T a permis de mettre en évidence qu'il existe des éléments synergiques dans la région promotrice du gène MFSD2a. En effet, plus le fragment de la région promotrice est grand, plus l'activité transcriptionnelle est importante (Figure 4.5). Les mutants A et B, correspondant respectivement aux régions -2404 à -1402 et -1402 à -402, ont permis de mettre en évidence que le promoteur basal n'est pas situé dans la région -2404 à -402 et qu'il n'y a pas d'autres promoteurs dans cette région. Le mutant C, composé des régions -2404 à -1402 et -402 à +42, a permis de mettre en évidence que les éléments de régulation, induisant une expression dans la région -2404 à -1402 sont actifs sur la région promotrice -402 à +42. Ces résultats montrent donc que la région promotrice en amont du gène a un impact direct sur l'expression de MFSD2a et que le promoteur minimal se trouve dans la région -402 à +42. Il aurait été intéressant de construire d'autres mutants de délétion, de plus en plus petits, dans la région -402 à +42 afin de déterminer la région exacte du promoteur, comme il avait été fait pour le promoteur du gène Syncytine-2 (Toufaily et al., 2015).

Considérant la découverte d'une potentielle boîte TATA par l'utilisation du 5' RACE, une mutation ponctuelle dans cette boîte TATA serait un moyen rapide de vérifier si cette séquence agit positivement sur l'initiation de la transcription.

Dans un troisième temps, il était intéressant de déterminer la sensibilité de la région promotrice à la forskoline. Les cellules BeWo ont été transfectées avec des plasmides contenant des fragments plus ou moins longs de la région promotrice de MFSD2a (Figure 4.6). Après transfection les cellules ont été induites à la forskoline [50µM]. Ceci a permis de mettre en évidence que la région promotrice -402 à +42 du gène MFSD2a est sensible à la forskoline et semble avoir une induction similaire à la région promotrice de Syncytine-2 (Figure 1.8). En effet, comme l'avait démontré Toufaily, *et al* (2015) pour la Syncytine-2, la stimulation à la forskoline du fragment de -2600 à +51 de la région promotrice augmente l'expression d'environ 3,5x, la région de -600 à +51 augmente l'expression d'environ 2x et la région de -450 à +51 augmente l'expression d'environ 5x (Toufaily et al., 2015). Il en va de même pour MFSD2a : l'induction de la région promotrice par la forskoline augmente l'expression de 3,5x pour la région -2404 à +42, d'environ 1,5x pour les régions -1400, -1209, -997, -798 et -600 à +42 et de 4,5x pour la région -402 à +42 (Figure 4.7). Ceci semble confirmer l'existence de similitudes quant à l'expression de MFSD2a et Syncytine-2, déjà démontrées dans la littérature (Toufaily et al., 2015, Liang et al., 2010).

L'étude de la région promotrice, bien qu'en bonne voie, n'est pas complète. Il reste à déterminer la région exacte et ses possibles partenaires d'interaction liant les séquences régulatrices du promoteur. Comme il a déjà été montré que GCM1 agit sur l'expression de MFSD2a et Syncytine-2 (Liang et al., 2010), il serait intéressant de continuer l'étude de la région promotrice de MFSD2a en utilisant les techniques de retard sur gel (*EMSA*), des mutants de délétion dans la région promotrice et/ou déterminer l'efficacité des différents facteurs de transcription déjà identifiés sur cette

région par l'utilisation du retard sur gel (*E.M.S.A.* ou *Electrophoresis Mobility Shift Assay*). Le site GCM1 serait positionné vers -150, et se retrouve dans le clone -402 testé (Liang et al., 2010). Celui-ci permettrait probablement de mettre en évidence la présence d'autres facteurs de transcriptions qui aideraient à comprendre les mécanismes de régulation du gène MFSD2a. Il est possible que les facteurs de transcriptions (absence, efficacité ou compétition) soient une des raisons de la diminution de l'expression de Syncytine-2 et MFSD2a déjà constatée dans les placentas pré-éclampsiques (Toufaily et al., 2013, Vargas et al., 2011). La région promotrice de Syncytine-2 possède un domaine CRE/AP-1-like entre -211 et -177 liant des complexes induits par la présence de forskoline (Toufaily et al., 2015), et il est possible que MFSD2a possède également une région ciblée par CRE/AP-1. D'ailleurs, des analyses informatiques de la région promotrice de MFSD2a indiquent des similitudes dans la région -381 à -370. Il pourrait être intéressant de tester la réponse de cette région promotrice en exprimant les facteurs CREB ou AP-1 afin de déterminer s'il y a une réponse positive.

5.3 Localisation de la protéine MFSD2a

L'objectif de la troisième partie de ce projet était de localiser la protéine MFSD2a à la surface des cellules et déterminer si l'utilisation d'une étiquette pouvait aider à sa détection et/ou sa localisation. La première étape nécessaire à la poursuite de cette étude protéique était la vérification de la spécificité des anticorps. Afin de confirmer qu'ils étaient bien spécifiques, ils ont été testés sur des lysats de cellules exprimant la protéine MFSD2a. Les immunobuvardages ont permis de mettre en évidence que l'anticorps anti-MFSD2a a une affinité pour sa protéine cible et qu'elle se retrouve dans le cerveau et les cytotrophoblastes villosités (Figure 4.8). Concernant l'utilisation de la protéine MFSD2a en fusion avec une étiquette, la transfection de cellules avec le plasmide exprimant la protéine MFSD2a-V5 a permis

de mettre en évidence la spécificité de l'anticorps anti-V5 pour l'étiquette, ce qui permet de détecter indirectement la protéine d'intérêt (Figure 4.9).

Une fois cette vérification effectuée, la transfection de cellules COS-7 avec le plasmide MFSD2a-V5 a permis de montrer que les deux anticorps sont aussi fonctionnels pour l'immunofluorescence. Le co-marquage des cellules avec l'anticorps anti-MFSD2a et anti-V5 montre une colocalisation du signal des deux anticorps, ce qui permet de confirmer la spécificité des anticorps. De plus, il a été possible de détecter l'étiquette V5 dans des cellules perméabilisées ou non perméabilisées (Figure 4.10). Cependant, considérant que l'isoforme 2 de MFSD2a est une protéine transmembranaire avec 10 domaines transmembranaires, cela signifierait que le dixième domaine, après lequel est située l'étiquette, serait à l'intérieur de la cellule (Figure 1.12), ce qui ne semble pas concorder avec une détection sans perméabilisation. Le signal détecté dans les cellules non perméabilisées pourrait s'expliquer par le fait que la solution de lavage utilisé pour l'immunomarquage contient une très faible concentration de Triton (0,05%) ayant pu perméabiliser les membranes.

Étonnamment, la même expérience réalisée dans les cellules HEK293T n'a pas permis de détecter la protéine MFSD2a sans l'étiquette V5. Il est possible qu'il existe une légère différence dans la maturation de la protéine dans ces deux lignées cellulaires, empêchant sa détection par l'anticorps mais conservant sa fonction. Il est possible qu'elle soit donc détectable avec un anticorps dirigé contre une autre partie de la protéine. C'est pourquoi l'anticorps anti-V5 a alors été utilisé afin de détecter l'étiquette, et indirectement MFSD2a (Figure 4.11). Après avoir constaté que les cellules fusionnent très vite après leur transfection avec des plasmides codant pour les protéines MFSD2a et Syncytine-2, nous avons décidé d'effectuer une analyse de l'expression de MFSD2a-V5 au cours du temps. Ceci a permis de mettre en évidence

qu'il est possible de détecter la protéine MFSD2a-V5 à la membrane seulement 4 heures après transfection (Figure 4.12).

La dernière partie de notre étude s'est intéressée à la relation MFSD2a et Syncytine-2. Il était important de vérifier que la présence de l'étiquette sur MFSD2a ne bloque pas la fusion cellulaire et qu'il serait possible de l'utiliser afin de la détecter lors de la formation d'un syncytium. Ceci nous a mené à transfecter des cellules HEK293T avec les plasmides exprimant MFSD2a-V5 et la Syncytine-2. Ceci a permis de mettre clairement en évidence que, lors de la formation d'un syncytium causé par l'interaction MFSD2a/Syncytine-2, MFSD2a semble être relocalisée au centre des cellules multinucléées alors que Syncytine-2 reste membranaire (Figure 4.13). Les résultats démontraient clairement la formation de ces « îlots » de protéine MFSD2a au cœur du syncytium (Figure 4.14). Il a déjà été montré que l'infection des cellules par le VIH induit, par l'activité de Nef, une internalisation et recyclage des protéines membranaires CD4 (Ross et al., 1999). Bien que, lors de la fusion cellulaire il n'y a pas de protéine Nef, il est possible de supposer qu'un changement aussi important que la fusion cellulaire induise un comportement inhabituel menant à l'internalisation de MFSD2a, afin d'être recyclés.

Afin de faire un lien avec les travaux précédemment réalisés sur la Syncytine-2 et les exosomes placentaires, il était intéressant d'étudier l'éventuelle présence de MFSD2a dans les exosomes. L'étude des exosomes dans ce contexte est utilisée afin de faire un parallèle avec les exosomes placentaires qui pourraient exprimer MFSD2a à leur surface. Les exosomes isolés du milieu de culture de cellules HEK293T transfectées avec le plasmide MFSD2a-V5 a permis, grâce à la cytométrie, de détecter MFSD2a sur les exosomes (Figure 4.15). Considérant que les exosomes proviennent de la membrane, nous avons supposé que ces derniers contiennent MFSD2a à leur surface. Cependant, comme expliqué précédemment, l'isoforme 2 de MFSD2a est une protéine avec 10 domaines transmembranaires, ce qui implique que

son dernier domaine est situé à l'intérieur des exosomes. Le positionnement de l'étiquette et sa détection dans les exosomes, est une question à laquelle il n'a pas encore été possible de répondre. Il aurait cependant été intéressant de reproduire cette expérience dans d'autres lignées placentaires avec la forme naturelle de MFSD2a associée aux exosomes, afin de chercher à vérifier sa présence. Il est aussi possible que cette détection soit liée à un problème de spécificité de l'anticorps.

Tout comme MFSD2a, LPA1 (*Lisophosphatidic Acid Receptor 1*) est un récepteur cellulaire avec plusieurs domaines transmembranaires. Il a été montré que l'addition d'étiquettes sur cette protéine, à proximité du dernier domaine transmembranaire nuit à l'adressage de cette protéine à la membrane (Zhao et al., 2014). Il est donc possible que la présence de deux étiquettes, V5 et His, dans le plasmide pEF6/MFSD2a-V5-His, utilisé dans cette recherche, puisse induire un défaut d'adressage ou de modifications post-traductionnelles au niveau de la protéine MFSD2a-V5-His, ce qui aurait pour effet de modifier sa détection. En effet, il est possible que le dernier domaine transmembranaire soit en fait extracellulaire, ce qui permettrait donc sa détection dans les cellules non perméabilisées et dans les exosomes.

L'étude de la protéine MFSD2a a permis de mettre en évidence que les anticorps anti-MFSD2a et anti-V5 utilisés sont spécifiques et peuvent fonctionner en immunofluorescence. Il serait donc pertinent de continuer d'utiliser cette technique afin de détecter MFSD2a dans d'autres cellules placentaires. Il serait aussi intéressant d'étudier la colocalisation des protéines MFSD2a et Syncytine-2 par immunofluorescence. Pour ce faire, il faudrait être en mesure de bloquer les cascades enzymatiques menant à la fusion cellulaire sans bloquer l'interaction ligand-récepteur. Il serait peut-être possible d'étudier cette fusion au niveau des exosomes et

voir si la présence de MFSD2a à leur membrane facilite leur prise en charge par les cellules, par l'interaction avec la Syncytine-2 membranaire.

Pour conclure, ces résultats permettent donc de vérifier la première hypothèse, confirmant ainsi que la transcription du gène MFSD2a est bien dépendante de l'activation de son promoteur, et qu'elle est sensible à la forskoline. La détection de la protéine MFSD2a dans les cellules et les exosomes confirme la seconde hypothèse que MFSD2a est bien associée à la membrane cellulaire. D'une manière générale les résultats de cette étude apportent quelques informations sur l'aspect fondamental de MFSD2a au niveau placentaire. Malheureusement, le manque de temps n'aura pas permis d'aller plus loin dans ces analyses. Il aurait été très intéressant de pouvoir continuer l'analyse de cette protéine dans les différentes lignées placentaires et comparer les résultats obtenus à des placentas pré-éclamptiques. Il reste donc encore beaucoup de travail à faire au niveau de la région promotrice et de la protéine, surtout dans les exosomes, afin de déterminer si MFSD2a joue un rôle dans la pré-éclampsie. La découverte des caractéristiques fondamentales de MFSD2a, comme son changement de positions après fusion cellulaire, pourrait potentiellement aider à la compréhension de la prééclampsie.

BIBLIOGRAPHIE

- ACIÉN, P., LLORET, G. & LLORET, M. 1990. Perinatal morbidity and mortality in pregnancy hypertensive disorders: prognostic value of the clinical and laboratory findings. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 32, 229-235.
- ADMYRE, C., JOHANSSON, S. M., QAZI, K. R., FILÉN, J.-J., LAHESMAA, R., NORMAN, M., NEVE, E. P. A., SCHEYNIUS, A. & GABRIELSSON, S. 2007. Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *The Journal of Immunology*, 179, 1969-1978.
- ANDRE, F., SCHARTZ, N. E. C., MOVASSAGH, M., FLAMENT, C., PAUTIER, P., MORICE, P., POMEL, C., LHOMME, C., ESCUDIER, B., LE CHEVALIER, T., TURSZ, T., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., ANGEVIN, E. & ZITVOGEL, L. 2002. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet*, 360, 295-305.
- ANGERS, M., ULDRY, M., KONG, D., GIMBLE, J. M. & JETTEN, A. M. 2008. Mfsd2a encodes a novel major facilitator superfamily domain-containing protein highly induced in brown adipose tissue during fasting and adaptive thermogenesis. *Biochem J*, 416, 347-55.
- ASEA, A., JEAN-PIERRE, C., KAUR, P., RAO, P., LINHARES, I. M., SKUPSKI, D. & WITKIN, S. S. 2008. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *Journal of Reproductive Immunology*, 79, 12-17.
- BALTIMORE, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*, 35, 235-41.
- BANERJI, J., RUSCONI, S. & SCHAFFNER, W. 1981. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, 27, 299-308.
- BEN-ZVI, A., LACOSTE, B., KUR, E., ANDREONE, B. J., MAYSHAR, Y., YAN, H. & GU, C. 2014. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature*, 509, 507-11.

- BERGER, J. H., CHARRON, M. J. & SILVER, D. L. 2012. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. *PLoS One*, 7, e50629.
- BLAISE, S., DE PARSEVAL, N., BÉNIT, L. & HEIDMANN, T. 2003. Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 13013-8.
- BLOND, J. L., LAVILLETTE, D., CHEYNET, V., BOUTON, O., ORIOL, G. & CHAPEL-FERNANDES, S. 2000a. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74.
- BLOND, J. L., LAVILLETTE, D., CHEYNET, V., BOUTON, O., ORIOL, G., CHAPEL-FERNANDES, S., MANDRAND, B., MALLET, F. & COSSET, F. L. 2000b. An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol*, 74, 3321-9.
- BRUSCHI, M., SANTUCCI, L., RAVERA, S., CANDIANO, G., BARTOLUCCI, M., CALZIA, D., LAVARELLO, C., INGLESE, E., RAMENGHI, L. A., PETRETTO, A., GHIGGERI, G. M. & PANFOLI, I. 2016. Human urinary exosome proteome unveils its aerobic respiratory ability. *J Proteomics*, 136, 25-34.
- BURKE, T. W. & KADONAGA, J. T. 1996. Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev*, 10, 711-24.
- BURKE, T. W. & KADONAGA, J. T. 1997. The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev*, 11, 3020-31.
- BURTON, G. J. & FOWDEN, A. L. 2015. The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 370.
- CABY, M. P., LANKAR, D., VINCENTEAU-SCHERRER, C., RAPOSO, G. & BONNEROT, C. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17, 879-87.

- CANN, A. J. 2016. Chapter 3 - Genomes. *Principles of Molecular Virology (Sixth Edition)*. Boston: Academic Press.
- CHAPARRO, A., GAEDECHENS, D., RAMIREZ, V., ZUNIGA, E., KUSANOVIC, J. P., INOSTROZA, C., VARAS-GODOY, M., SILVA, K., SALOMON, C., RICE, G. & ILLANES, S. E. 2016. Placental biomarkers and angiogenic factors in oral fluids of patients with preeclampsia. *Prenat Diagn*, 36, 476-82.
- CHEN, C. P., WANG, K. G., CHEN, C. Y., YU, C., CHUANG, H. C. & CHEN, H. 2006. Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre-eclampsia. *Bjog*, 113, 152-8.
- CHEN, J. Z., SHEEHAN, P. M., BRENNKE, S. P. & KEOGH, R. J. 2012. Vessel remodelling, pregnancy hormones and extravillous trophoblast function. *Mol Cell Endocrinol*, 349, 138-44.
- CHEN, T. & DENT, S. Y. 2014. Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat Rev Genet*, 15, 93-106.
- COCUCCI, E., RACCHETTI, G. & MELDOLESI, J. 2009. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*, 19, 43-51.
- CULLEN, B. R. & GREENE, W. C. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell*, 58, 423-6.
- DARLIX, J. L. 1986. Control of Rous sarcoma virus RNA translation and packaging by the 5' and 3' untranslated sequences. *J Mol Biol*, 189, 421-34.
- DE GRUTTOLA, V., MAYER, K. & BENNETT, W. 1986. AIDS: has the problem been adequately assessed? *Rev Infect Dis*, 8, 295-305.
- DE PARSEVAL, N. & HEIDMANN, T. 2005. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res*, 110, 318-32.
- DELIDAKI, M., GU, M., HEIN, A., VATISH, M. & GRAMMATOPOULOS, D. K. 2011. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 332, 213-20.
- DENNER, J. 2016. Expression and function of endogenous retroviruses in the placenta. *Apmis*, 124, 31-43.

- DHAR, R., MCCLEMENTS, W. L., ENQUIST, L. W. & VANDE WOUDE, G. F. 1980. Nucleotide sequences of integrated Moloney sarcoma provirus long terminal repeats and their host and viral junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3937-41.
- DUPRESSOIR, A., LAVIALLE, C. & HEIDMANN, T. 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*, 33, 663-71.
- ESNAULT, C., PRIET, S., RIBET, D., VERNOCHET, C., BRULS, T., LAVIALLE, C., WEISSENBAACH, J. & HEIDMANN, T. 2008. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17532-7.
- FABER, J. J. 1993. Diffusion permeability of the immature placenta of the rabbit embryo to inert hydrophilic molecules. *Am J Physiol*, 265, H1804-8.
- FASSLER, J. S. & GUSSIN, G. N. 1996. Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies. *Methods Enzymol*, 273, 3-29.
- FLINT, S. J. 2004. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*, ASM Press.
- GANAPATHY, V., PRASAD, P. D., GANAPATHY, M. E. & LEIBACH, F. H. 2000. Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J Pharmacol Exp Ther*, 294, 413-20.
- HAHN, S., BURATOWSKI, S., SHARP, P. A. & GUARENTE, L. 1989. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5718-22.
- HE, B., CHEN, C., TENG, L. & TAN, K. 2014. Global view of enhancer-promoter interactome in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E2191-9.
- JOHNSTONE, R. M., ADAM, M., HAMMOND, J. R., ORR, L. & TURBIDE, C. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*, 262, 9412-20.
- KALAMVOKI, M. & DESCHAMPS, T. 2016. Extracellular vesicles during Herpes Simplex Virus type 1 infection: an inquire. *Virol J*, 13, 63.

- KATAKOWSKI, M. & CHOPP, M. 2016. Exosomes as Tools to Suppress Primary Brain Tumor. *Cell Mol Neurobiol*.
- KEITH, J. C., JR., PIJNENBORG, R. & VAN ASSCHE, F. A. 2002. Placental syncytin expression in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, 187, 1122-3; author reply 1123-4.
- KELLER, S., SANDERSON, M. P., STOECK, A. & ALTEVOGT, P. 2006. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, 107, 102-8.
- KHANUM, A. & DUFAU, M. L. 1986. Inhibitory action of forskolin on adenylate cyclase activity and cyclic AMP generation. *J Biol Chem*, 261, 11456-9.
- KHOLIA, S., RANGHINO, A., GARNIERI, P., LOPATINA, T., DEREGIBUS, M. C., RISPOLI, P., BRIZZI, M. F. & CAMUSSI, G. 2016. Extracellular vesicles as new players in angiogenesis. *Vascul Pharmacol*.
- KIM, T. K., HEMBERG, M., GRAY, J. M., COSTA, A. M., BEAR, D. M., WU, J., HARMIN, D. A., LAPTEWICZ, M., BARBARA-HALEY, K., KUERSTEN, S., MARKENSCOFF-PAPADIMITRIOU, E., KUHL, D., BITO, H., WORLEY, P. F., KREIMAN, G. & GREENBERG, M. E. 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 465, 182-7.
- KNERR, I., BEINDER, E. & RASCHER, W. 2002. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: Evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 186, 210-213.
- KOSAKA, N., IZUMI, H., SEKINE, K. & OCHIYA, T. 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1, 7.
- KUBO, Y., HAYASHI, H., MATSUYAMA, T., SATO, H. & YAMAMOTO, N. 2012. Retrovirus entry by endocytosis and cathepsin proteases. *Adv Virol*, 2012, 640894.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, Y., STOJANOVIC, N.,

- SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LARSSON, L. I., BJERREGAARD, B. & TALTS, J. F. 2008. Cell fusions in mammals. *Histochem Cell Biol*, 129, 551-61.
- LAVIALLE, C., CORNELIS, G., DUPRESSOIR, A., ESNAULT, C., HEIDMANN, O., VERNOCHE, C. & HEIDMANN, T. 2013. Paleovirology of 'syncytins', retroviral env genes exapted for a role in placentation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 368.
- LE BELLEGO, F., VAILLANCOURT, C. & LAFOND, J. 2009. Isolation and culture of term human cytotrophoblast cells and in vitro methods for studying human cytotrophoblast cells' calcium uptake. *Methods Mol Biol*, 550, 73-87.
- LI, F. & KARLSSON, H. 2016. Expression and regulation of human endogenous retrovirus W elements. *Apmis*, 124, 52-66.
- LIANG, C. Y., WANG, L. J., CHEN, C. P., CHEN, L. F., CHEN, Y. H. & CHEN, H. 2010. GCM1 regulation of the expression of syncytin 2 and its cognate receptor MFSD2A in human placenta. *Biol Reprod*, 83, 387-95.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & BROCK, T. D. 2006. *Brock biology of microorganisms*, Upper Saddle River, NJ, Pearson Prentice Hall.
- MADISON, M. N., ROLLER, R. J. & OKEOMA, C. M. 2014. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology*, 11, 102.

- MALASSINE, A., HANDSCHUH, K., TSATSARIS, V., GERBAUD, P., CHEYNET, V., ORIOL, G., MALLET, F. & EVAIN-BRION, D. 2005. Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta. *Placenta*, 26, 556-62.
- MANGENEY, M., RENARD, M., SCHLECHT-LOUF, G., BOUALLAGA, I., HEIDMANN, O., LETZELTER, C., RICHAUD, A., DUCOS, B. & HEIDMANN, T. 2007. Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20534-9.
- MCGUIRE, T. C., CRAWFORD, T. B. & HENSON, J. B. 1971. Immunofluorescent localization of equine infectious anemia virus in tissue. *Am J Pathol*, 62, 283-94.
- MI, S., LEE, X., LI, X.-P., VELDMAN, G. M., FINNERTY, H., RACIE, L., LAVALLIE, E., TANG, X.-Y., EDOUARD, P., HOWES, S., KEITH, J. C. & MCCOY, J. M. 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, 403, 785-789.
- MINCHEVA-NILSSON, L. & BARANOV, V. 2010. The role of placental exosomes in reproduction. *Am J Reprod Immunol*, 63, 520-33.
- MITCHELL, M. D., PEIRIS, H. N., KOBAYASHI, M., KOH, Y. Q., DUNCOMBE, G., ILLANES, S. E., RICE, G. E. & SALOMON, C. 2015. Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 213, S173-S181.
- PATSCHINSKY, T., SCHROEER, B. & BISTER, K. 1986. Protein product of proto-oncogene c-mil. *Mol Cell Biol*, 6, 739-44.
- PEDERSEN, A. G., BALDI, P., CHAUVIN, Y. & BRUNAK, S. 1999. The biology of eukaryotic promoter prediction--a review. *Comput Chem*, 23, 191-207.
- PEREZ, L. G., O'DONNELL, M. A. & STEPHENS, E. B. 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J Virol*, 66, 4134-43.
- POMMIER, Y., JOHNSON, A. A. & MARCHAND, C. 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 236-48.

- PRUDHOMME, S., BONNAUD, B. & MALLET, F. 2005. Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet Genome Res*, 110, 353-64.
- PRUITT, K. D., HARROW, J., HARTE, R. A., WALLIN, C., DIEKHANS, M., MAGLOTT, D. R., SEARLE, S., FARRELL, C. M., LOVELAND, J. E., RUEF, B. J., HART, E., SUNER, M. M., LANDRUM, M. J., AKEN, B., AYLING, S., BAERTSCH, R., FERNANDEZ-BANET, J., CHERRY, J. L., CURWEN, V., DICUCCIO, M., KELLIS, M., LEE, J., LIN, M. F., SCHUSTER, M., SHKEDA, A., AMID, C., BROWN, G., DUKHANINA, O., FRANKISH, A., HART, J., MAIDAK, B. L., MUDGE, J., MURPHY, M. R., MURPHY, T., RAJAN, J., RAJPUT, B., RIDDICK, L. D., SNOW, C., STEWARD, C., WEBB, D., WEBER, J. A., WILMING, L., WU, W., BIRNEY, E., HAUSSLER, D., HUBBARD, T., OSTELL, J., DURBIN, R. & LIPMAN, D. 2009. The consensus coding sequence (CCDS) project: Identifying a common protein-coding gene set for the human and mouse genomes. *Genome Res*, 19, 1316-23.
- PUSIC, K. M., PUSIC, A. D. & KRAIG, R. P. 2016. Environmental Enrichment Stimulates Immune Cell Secretion of Exosomes that Promote CNS Myelination and May Regulate Inflammation. *Cell Mol Neurobiol*, 36, 313-25.
- QIN, J. & XU, Q. 2014. Functions and application of exosomes. *Acta Pol Pharm*, 71, 537-43.
- QIN, W., TSUKASAKI, Y., DASGUPTA, S., MUKHOPADHYAY, N., IKEBE, M. & SAUTER, E. R. 2016. Exosomes in Human Breast Milk Promote EMT. *Clin Cancer Res*.
- RENARD, M., VARELA, P. F., LETZELTER, C., DUQUERROY, S., REY, F. A. & HEIDMANN, T. 2005. Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates. *J Mol Biol*, 352, 1029-34.
- ROBERTS, R. M., GREEN, J. A. & SCHULZ, L. C. 2016. The evolution of the placenta. *Reproduction*, 152, R179-89.
- ROSS, T. M., ORAN, A. E. & CULLEN, B. R. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol*, 9, 613-21.
- RUEBNER, M., STRISSEL, P. L., LANGBEIN, M., FAHLBUSCH, F., WACHTER, D. L., FASCHINGBAUER, F., BECKMANN, M. W. & STRICK, R. 2010.

Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes. *J Mol Med (Berl)*, 88, 1143-56.

SALOMON, C., TORRES, M. J., KOBAYASHI, M., SCHOLZ-ROMERO, K., SOBREVIA, L., DOBIERZEWSKA, A., ILLANES, S. E., MITCHELL, M. D. & RICE, G. E. 2014. A Gestational Profile of Placental Exosomes in Maternal Plasma and Their Effects on Endothelial Cell Migration. *PLoS One*, 9.

SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94, 441-448.

SARKER, S., SCHOLZ-ROMERO, K., PEREZ, A., ILLANES, S. E., MITCHELL, M. D., RICE, G. E. & SALOMON, C. 2014. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *Journal of Translational Medicine*, 12, 1-19.

SATO, K., MENG, F., GLASER, S. & ALPINI, G. 2016. Exosomes in liver pathology. *J Hepatol*.

SEIBERT, S. A., HOWELL, C. Y., HUGHES, M. K. & HUGHES, A. L. 1995. Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol*, 12, 803-13.

SIMPSON, R. A., MAYHEW, T. M. & BARNES, P. R. 1992. From 13 weeks to term, the trophoblast of human placenta grows by the continuous recruitment of new proliferative units: a study of nuclear number using the disector. *Placenta*, 13, 501-12.

SINGER, V. L., WOBBE, C. R. & STRUHL, K. 1990. A wide variety of DNA sequences can functionally replace a yeast TATA element for transcriptional activation. *Genes Dev*, 4, 636-45.

SMALE, S. T. 1997. Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim Biophys Acta*, 1351, 73-88.

SPINOLA, M., FALVELLA, F. S., COLOMBO, F., SULLIVAN, J. P., SHAMES, D. S., GIRARD, L., SPESSOTTO, P., MINNA, J. D. & DRAGANI, T. A. 2010. MFSD2A is a novel lung tumor suppressor gene modulating cell cycle and matrix attachment. *Mol Cancer*, 9, 62.

- SPINOLA, M., FALVELLA, F. S., GALVAN, A., PIGNATIELLO, C., LEONI, V. P., PASTORINO, U., PARONI, R., CHEN, S., SKAUG, V., HAUGEN, A. & DRAGANI, T. A. 2007. Ethnic differences in frequencies of gene polymorphisms in the MYCL1 region and modulation of lung cancer patients' survival. *Lung Cancer*, 55, 271-7.
- TOOI, M., KOMAKI, M., MORIOKA, C., HONDA, I., IWASAKI, K., YOKOYAMA, N., AYAME, H., IZUMI, Y. & MORITA, I. 2016. Placenta Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Confer Plasticity on Fibroblasts. *J Cell Biochem*, 117, 1658-70.
- TOUFAILY, C., LOKOSSOU, A. G., VARGAS, A., RASSART, E. & BARBEAU, B. 2015. A CRE/AP-1-like motif is essential for induced syncytin-2 expression and fusion in human trophoblast-like model. *PLoS One*, 10, e0121468.
- TOUFAILY, C., VARGAS, A., LEMIRE, M., LAFOND, J., RASSART, E. & BARBEAU, B. 2013. MFSD2a, the Syncytin-2 receptor, is important for trophoblast fusion. *Placenta*, 34, 85-8.
- UHLEN, M., FAGERBERG, L., HALLSTROM, B. M., LINDSKOG, C., OKSVOLD, P., MARDINOGLU, A., SIVERTSSON, A., KAMPF, C., SJOSTEDT, E., ASPLUND, A., OLSSON, I., EDLUND, K., LUNDBERG, E., NAVANI, S., SZIGYARTO, C. A., ODEBERG, J., DJUREINOVIC, D., TAKANEN, J. O., HOBER, S., ALM, T., EDQVIST, P. H., BERLING, H., TEGEL, H., MULDER, J., ROCKBERG, J., NILSSON, P., SCHWENK, J. M., HAMSTEN, M., VON FEILITZEN, K., FORSBERG, M., PERSSON, L., JOHANSSON, F., ZWAHLEN, M., VON HEIJNE, G., NIELSEN, J. & PONTEN, F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347, 1260419.
- VAN DER KUYL, A. C. 2012. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology*, 9, 1-10.
- VAN GIAU, V. & AN, S. S. 2016. Emergence of exosomal miRNAs as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 360, 141-52.
- VARGAS, A., MOREAU, J., LE BELLEGO, F., LAFOND, J. & BARBEAU, B. 2008. Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Placenta*, 29, 170-4.

- VARGAS, A., TOUFAILY, C., LEBELLEGO, F., RASSART, E., LAFOND, J. & BARBEAU, B. 2011. Reduced expression of both syncytin 1 and syncytin 2 correlates with severity of preeclampsia. *Reprod Sci*, 18, 1085-91.
- VARGAS, A., ZHOU, S., ETHIER-CHIASSON, M., FLIPO, D., LAFOND, J., GILBERT, C. & BARBEAU, B. 2014. Syncytin proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *Faseb j*, 28, 3703-19.
- WONG, B. H., CHAN, J. P., CAZENAVE-GASSIOT, A., POH, R. W., FOO, J. C., GALAM, D. L., GHOSH, S., NGUYEN, L. N., BARATHI, V. A., YEO, S. W., LUU, C. D., WENK, M. R. & SILVER, D. L. 2016. Mfsd2a Is a Transporter for the Essential omega-3 Fatty Acid Docosahexaenoic Acid (DHA) in Eye and Is Important for Photoreceptor Cell Development. *J Biol Chem*, 291, 10501-14.
- YAMADA, K., OGAWA, H., HONDA, S., HARADA, N. & OKAZAKI, T. 1999. A GCM motif protein is involved in placenta-specific expression of human aromatase gene. *J Biol Chem*, 274, 32279-86.
- ZHAO, J., WEI, J., BOWSER, R. K., DONG, S., XIAO, S. & ZHAO, Y. 2014. Molecular regulation of lysophosphatidic acid receptor 1 trafficking to the cell surface. *Cell Signal*, 26, 2406-11.